

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
Campus Baixada Santista

PEDRO HENRIQUE DOS SANTOS PRADO

**METABOLISMO DE RATOS WISTAR PRIVADOS
DE SONO PARADOXAL**

Santos

2012

PEDRO HENRIQUE DOS SANTOS PRADO

METABOLISMO DE RATOS WISTAR PRIVADOS DE SONO PARADOXAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de São Paulo como parte dos
requisitos curriculares para obtenção do título de bacharel
em Educação Física – Modalidade Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Hanna Karen Moreira Antunes

Santos

2012

PEDRO HENRIQUE DOS SANTOS PRADO

METABOLISMO DE RATOS WISTAR PRIVADOS DE SONO PARADOXAL

Este exemplar corresponde à redação final do Trabalho de Conclusão de Curso defendido por Pedro Henrique dos Santos Prado e aprovado pela banca examinadora em 19/02/2013

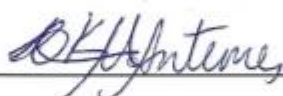
Profa. Dra. Hanna Karen Moreira Antunes

Orientadora

Santos

2012

Banca examinadora



Hanna Karen Moreira Antunes

Orientadora



Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos

Membro Titular Da Banca



Ana Raimunda Dâmaso

Membro Titular Da Banca

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio constante não só durante a graduação, mas durante toda minha vida.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, tios, irmãos, primos pelo apoio e compreensão na minha escolha profissional.

A minha orientadora, que aturou meu gênio durante estes últimos 15 meses.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa, Marcos, Sara Helton, Murilo e Paulo, sobretudo aos dois primeiros, que sempre estiveram por perto para me apoiar, ajudar, orientar nas tarefas do estudo.

A meu orientador postigo, Marcos Mônico, que além de me ajudar na parte acadêmica me cedeu sua amizade e me abrigou durante períodos difíceis.

Aos meus amigos da Turma 4 de Educação Física, Walkiria, Tatiana, Elizabeth, Caio e João, com os quais compartilhei muitos bons momentos e sempre me apoiaram nos momentos ruins, mostrando-me o verdadeiro significado de amizade.

Aos demais colegas de turma por fazerem desta, um dos grupos mais acolhedores e amigáveis que já conheci.

Ao meu amigo de infância, Fabiano, com o qual compartilho uma amizade que se equipara a uma relação de irmãos, e que sempre esteve me apoiando durante todo meu percurso, do ensino fundamental até o hoje.

Aos professores Odair e Vânia, por me proporcionarem o primeiro contato com atividade extracurricular oferecendo-me uma vaga para atuar na monitoria do MAC, sendo este o momento em que comecei a sentir-me útil e confiante dentro da faculdade.

A todos os professores de todos os eixos, sem exceção, por sua excelência no ensino e por me tornarem uma pessoa mais madura não só academicamente.

A FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao CEPE, pela parceria no desenvolvimento do trabalho.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Introdução: O sono é um processo importante na manutenção da saúde, das funções fisiológicas e da saúde cognitiva. Modelos animais sugerem que a privação do sono paradoxal (PSP) está associada com importantes prejuízos em eixos hormonais específicos, instaurando um ambiente essencialmente catabólico, que favorece o processo de atrofia muscular e perda de peso corporal, com potencial impacto sobre o metabolismo basal. **Objetivos:** investigamos os efeitos da PSP por 96 horas sobre a massa corporal, taxa metabólica basal, eixos hormonais e na histomorfometria do músculo esquelético de ratos machos da linhagem Wistar.

Metodologia: Foi utilizado um total de 40 ratos com três meses de idade e peso entre 300-350 gramas, divididos em quatro grupos de acordo com sua massa corporal: Controle (CTRL), Privação de Sono Paradoxal (PSP96h), Metabolismo e Privação de Sono (MET.PSP96h) e Sham (SHAM). Os animais experimentais foram submetidos à PSP pelo Método das Plataformas Múltiplas Modificado (SUCHECKI e TUFIK, 2000), sendo avaliados para o metabolismo através de um sistema de calorimetria indireta (Oxymax open-circuit calorimeter- Columbus Instruments, Ohio- USA), antes e após a privação (grupo MET.PSP96h). Após a eutanásia dos animais, o sangue foi coletado para análise do perfil hormonal da Testosterona, Corticosterona, IGF-1, T₃ e T₄. Além disso, o músculo *Tibialis anterior* foi dissecado para posterior análise histomorfométrica e as adrenais, fígado, baço e gorduras foram retirados para análises complementares da composição corporal. Também foi monitorado o consumo de ração e água, bem como a produção de excrementos dos animais. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo / Hospital São Paulo, sob protocolo número 0764/10. **Resultados:** Observamos que os animais privados de sono tiveram um aumento significativo do metabolismo, dado pelo aumento no $\dot{V}O_2$ na situação rebote (24h pós privação). Além disso, os ratos privados tiveram aumento na Corticosterona e diminuição na liberação de Testosterona e IGF-1. Quanto aos hormônios da tireóide, nossos dados mostraram que há uma tendência de aumento no T₃ e diminuição no T₄, sugerindo uma relação entre eles. Todas as alterações hormonais avaliadas apresentaram uma inclinação a retornarem a seus valores basais na situação rebote. A histologia do músculo *Tibialis Anterior* revelou um quadro de atrofia muscular, dado pela diminuição na área de secção transversa das fibras musculares, que juntamente com redução dos outros tecidos avaliados (gorduras, fígado e baço) podem explicar o declínio do peso dos animais privados de sono. **Conclusão:** Portanto, nossos dados sugerem que a privação de sono altera o organismo de maneira a favorecer um ambiente catabólico, afetando de forma negativa grande parte dos tecidos e sistemas e com potencial impacto maléfico sobre a saúde.

Palavras-chave: privação de sono, taxa metabólica basal, hormônios e metabolismo.

ABSTRACT

Background: Sleep is a highly important process in health, physiological functions and cognition. Animal models suggest that paradoxical sleep deprivation (PSD) is associated with significant impairment in hormonal release, generating a catabolic environment, which supports muscle atrophy e body weight loss, affecting metabolic rate. **Goals:** We therefore investigated the effects of PSD for 96 hours on body mass, metabolic rate, hormonal release and skeletal muscle histomorphometry in male Wistar rats. **Methods:** Forty, three months old rats were used, with an average weight of 300-350 grams. They were distributed in four groups: Control (CTRL), Paradoxical Sleep Deprivation (PSP96h), Metabolism and PSD (MET.PSP96h) and Sham (SHAM). The PSD protocol used was the Modified Multiple Platforms Method (SUCHECKI e TUFIK, 2000), the metabolic system was an indirect calorimetry (Oxymax open-circuit calorimeter- Columbus Instruments, Ohio- USA) used before and after the PSD (MET.PSP96h group). Following euthanasia, blood samples were collected for hormonal analysis of: Testosterone, Corticosterone, IGF-1, T_3 and T_4 . Furthermore, *Tibialis anterior* muscle was removed from carcass for histomorphometric analysis, and adrenal, liver, spleen and fat tissue was collected for complementary body composition analyzes. We also monitored water and food intake, as well as excrements production. The study was approved by Ethics Committee of Universidade Federal de São Paulo under the protocol number 0764/10. **Results:** We noticed that PSD animals had a relative rise in resting metabolic rate. Besides, PSD rats showed elevation in Corticosterone and decrease in anabolic hormones, such as Testosterone and IGF-1. With respect to thyroid hormones, our data indicated a trend in increasing of T_3 while decreasing T_4 , which suggests a possible relation. All hormonal alterations tended to return to baseline values after 24h recovery sleep. The *Tibialis anterior* histomorphometric analysis revealed muscle atrophy, showing significant decrease in cross-sectional area, which combined with the reduction of other tissues (liver, spleen and fat) may explain the body weight loss. **Conclusion:** Our data suggest that PSD changes de organism homeostasis, which promotes a catabolic environment and adversely affects most tissues and systems, generating health impairment.

Key words: sleep deprivation, basal metabolic rate, hormones and metabolism.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	9
<i>Sono e Privação de Sono.....</i>	<i>9</i>
<i>Aspectos endócrinos relacionados ao sono.....</i>	<i>11</i>
<i>Taxa Metabólica.....</i>	<i>15</i>
<i>Taxa Metabólica e Sono.....</i>	<i>17</i>
<i>Considerações e Problemática.....</i>	<i>20</i>
2. Material e Métodos.....	22
2.1 Animais experimentais e condições ambientais.....	22
2.2 Cuidados éticos para com os procedimentos experimentais.....	22
2.3 Protocolos Experimentais e Procedimentos.....	23
<i>Composição de Grupos Experimentais.....</i>	<i>23</i>
<i>Privação de Sono Paradoxal.....</i>	<i>23</i>
<i>Avaliação Metabólica.....</i>	<i>24</i>
<i>Coleta e Análises Sanguíneas.....</i>	<i>25</i>
<i>Histologia e área de secção transversa.....</i>	<i>26</i>
<i>Coletas Complementares.....</i>	<i>27</i>
<i>Ração Ofertada aos Animais Durante o Experimento.....</i>	<i>27</i>
2.4 Análise Estatística.....	29
3. Resultados.....	30
4. Discussão.....	38
5. Conclusão.....	43
6. Referências Bibliográficas.....	44
7. Anexos.....	52

1. INTRODUÇÃO

Sono e Privação de Sono

O sono é uma operação mental que ocupa cerca de um terço da vida dos seres humanos, ainda sim poucos são os fenômenos tão limitadamente desvendados como este (TUFIK *et al.*, 2009). Porém, duas linhas de raciocínio sustentam a ideia de que o sono é um processo fundamental para qualquer organismo: a primeira diz que o sono persistiu durante a evolução das espécies por permitir o desenvolvimento de vantagens adaptativas; a segunda diz respeito a gama de trabalhos científicos demonstrando os infindáveis processos deletérios da supressão do mesmo (MAQUET, 1995).

Segundo Tufik *et al.* (2009) “o sono é um estado alterado de consciência, que leva o indivíduo a relativa imobilidade, com diminuição de resposta aos estímulos externos e que se difere dos demais estados por ser prontamente reversível”. Não se sabe ao certo o que faz com que esta operação aconteça, mas existem duas abordagens clássicas sobre o ciclo sono-vigília: Circadiana e Fisiológica. Isto é, existe um Componente Circadiano que endereça a vontade de dormir a um comportamento intrínseco e espontâneo, dependendo do tempo que se fica acordado. Mas também existe um Componente Homeostático que diz “quanto maior o tempo acordado mais profundo é o sono”, o que favorece os processos recuperativos do organismo (DAAN *et al.*, 1984).

O ato de dormir não é um processo homogêneo entre indivíduos de uma mesma espécie. Isto porque existem muitos fatores que influenciam a quantidade e a qualidade do sono, tais como: idade, alimentação, atividade física, hábitos saudáveis, fatores socioeconômicos e culturais, e também a genética (GILLIN *et al.*, 1981; SINGH *et al.*, 1997, ANDRETIC *et al.*, 2008). Desta forma, um estudo transversal envolvendo mais de dez mil homens e mulheres, noruegueses, com idades entre 40 e 45 anos, com diferentes condições de saúde, econômica e social, trabalhadores rurais e urbanos, mostrou que a quantidade subjetiva de sono, a quantidade de sono total e a latência do sono estão diretamente relacionadas àqueles fatores, e também que homens têm sono mais curto do que mulheres (URSIN *et al.*, 2005).

É possível notar dois estágios muito distintos do sono: uma fase NREM¹ e uma REM². O sono NREM, caracterizado pela ausência de movimentos dos olhos e lentificação

¹ Do inglês Rapid Eye Movements: fase do sono que se caracteriza pela presença de movimentos dos olhos

progressiva da atividade cortical é subdividido em três estágios (ou fases): N1 (sonolência); N2 (sono “leve”); N3 (sono de ondas lentas). Esses estágios usualmente ocorrem em sequência, frequentemente com flutuações ao longo da noite. Logo em seguida ocorre o sono REM que tem como principais características o movimento rápido dos olhos e atonia muscular, além de ser o período em que ocorre a maior parte dos sonhos (IBER *et al.*, 2007; ASERINSKY, 1996; MATHIS, 1995). Ao que parece, o sono NREM permite que o organismo conserve energia e se recupere do desgaste durante o período de vigília, enquanto que o sono REM promove a consolidação da memória e restabelecimento dos padrões emocionais e comportamentais (TUFIK *et al.*, 2009). Em ratos, o sono REM também é denominado sono paradoxal, uma vez que o padrão eletroencefalográfico é semelhante ao da vigília, apesar da atonia muscular que sugere um sono profundo (JOUVET, 1994).

A literatura vem demonstrando que o sono tem funções fisiológicas importantes. Nesse âmbito, vários modelos foram sugeridos na tentativa de explicitar suas funções, entre eles, o modelo restaurador foi uma das primeiras teorias sobre a função do sono. O sono serviria para recuperar ou reverter os processos bioquímicos e fisiológicos degradados durante o estado de vigília, restaurando assim, a capacidade do organismo. Dados de animais privados de sono apoiam esta teoria por apresentar, geralmente, um sono mais consolidado e mais longo no período de recuperação (BONNET *et al.*, 1991). No entanto, ainda não se sabe se o sono tem papel relevante sobre os processos fisiológicos de todo o organismo ou somente de alguns órgãos (MAQUET, 1995).

Se por um lado o sono tem se mostrado incumbido de papéis fundamentais à vida, alterações neste âmbito levam a instalação de diversos prejuízos. Déficits na eficiência do processamento cognitivo, do tempo de reação, da responsividade atencional, prejuízo na memória, aumento da irritabilidade, alterações metabólicas, endócrinas, imunológicas, neuroquímicas, quadros hipertensivos, cansaço, náuseas, dores de cabeça, ardência nos olhos, visão turva, dores articulares e diminuição da libido são alguns dos muitos processos deletérios que a redução da quantidade e/ou qualidade do sono originam (SHEPARD e SHEK, 1997; SPIEGEL *et al.*, 1999; BROUWERS e LENDERS, 2000; HARRISON *et al.*, 2000; BONNET e ARAND, 2003).

Não é por acaso que os distúrbios do sono estão entre as patologias mais comuns e que mais geram prejuízos sobre a qualidade de vida da sociedade atual. A privação de sono em si já representa um tipo de estresse que pode levar a sérias consequências fisiológicas, e já

² Do inglês Non-Rapid Eye Movements: fase do sono que não apresenta movimentos dos olhos.

foi demonstrado que quando esta é prolongada por muito tempo em animais de laboratório pode haver morte dos mesmos (RECHTSCHAFFEN *et al.*, 1983). Da mesma forma, humanos tendem a ter fatores de riscos à mortalidade aumentados quando apresentam uma baixa qualidade de sono, como maiores chances de desenvolverem obesidade, diabetes, dislipidemias, problemas cardiovasculares e até óbito causado por acidentes de trânsito devido à sonolência (GRANDNER e PACK, 2011). Além disso, distúrbios do sono estão diretamente relacionados a transtornos mentais, sendo muito comum pessoas com problemas como insônia e apneia do sono apresentarem quadros de ansiedade e depressão (TAYLOR *et al.*, 2005).

Aspectos endócrinos relacionados ao sono

O sono está associado à modulação de muitos hormônios. Particularmente dois deles, o cortisol e o hormônio do crescimento (GH), são os mais bem documentados na literatura que parecem ser afetados diretamente pelo sono, em uma relação dose-resposta (STEIGER *et al.*, 1998). O GH permanece baixo durante o dia, atingindo seu pico de liberação durante a primeira fase do sono de ondas lentas, enquanto o cortisol apresenta o comportamento oposto. Além disso, hormônios relacionados à fome e saciedade, como leptina e grelina, têm sua secreção elevada durante a noite, ao mesmo tempo em que ocorre o aumento na tolerância à glicose e diminuição da sensibilidade à insulina (LEPROULT e VAN CAUTER, 2010).

Em contrapartida, já foi demonstrado que a supressão parcial ou total do sono leva a notáveis mudanças fisiológicas e comportamentais. Mas talvez, uma das características mais distintas deste fenômeno seja sua capacidade em alterar dramaticamente os diversos eixos endócrinos do organismo (VAN CAUTER *et al.*, 2008). Desta forma, diversos estudos têm mostrado que o sono curto ou insuficiente leva a modificações consideráveis sobre os eixos gonadais e aqueles relacionados ao metabolismo, fome e saciedade, alterando a secreção hormônios como: insulina, catecolaminas, cortisol em humanos e corticosterona em animais, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), GH, hormônios da tireóide, testosterona, estrógeno, progesterona, grelina e leptina (ANDERSEN *et al.*, 2005; BUXTON, *et al.* 2012; GARY *et al.*, 1996; VAN CAUTER *et al.*, 2008).

Alguns trabalhos têm então evidenciado que as alterações endócrinas decorrentes da privação de sono podem estar relacionadas ao aparecimento de distúrbios metabólicos. Neste sentido, Buxton *et al.* (2012) concluíram recentemente que a restrição de sono crônica leva a um aumento no risco de diabetes e obesidade em humanos. Os autores realizaram um

estudo com 24 indivíduos, de ambos os sexos e saudáveis, os quais foram submetidos a um protocolo de restrição de sono por três semanas, tendo um total de 5,6 horas de sono a cada 24 horas. Eles constataram que a exposição à restrição parcial de sono crônica levou seus voluntários à redução na secreção de insulina pós-prandial em 32% em relação aos não restritos, prejudicando o metabolismo glicídico e sugerindo que a restrição gera disfunção pancreática. Além disto, eles também observaram uma queda na taxa metabólica de repouso dos voluntários durante o período de restrição. Outros dados suportam este achado, visto que a privação de sono diminui a capacidade do organismo em metabolizar a glicose além de reduzir a sensibilidade à insulina (BOETHEL, 2002; KNUTSON *et al.*, 2007). Assim, Schmid *et al.*, (2011) realizaram um trabalho com 15 homens saudáveis, os quais foram submetidos a restrição parcial do sono por duas noites consecutivas. Eles notaram que não houve diferença entre os parâmetros de insulina e glicemia durante o repouso após a intervenção. Porém, estes mesmos hormônios apresentaram um maior pico no momento pós-prandial, sugerindo um aumento na intolerância a glicose, a qual é decorrente da diminuição na sensibilidade à insulina.

Alterações nos hormônios do metabolismo glicídico também estão relacionadas a modificações no balanço energético de indivíduos privados de sono, uma vez que a insulina tem efeito anorexígeno no hipotálamo (VAN CAUTER *et al.*, 2008). Da mesma forma, alguns estudos sobre as concentrações de grelina e leptina - hormônios *orexígeno*³ e *anorexígeno*⁴, respectivamente – têm os postulado como geradores da alta ingesta de alimentos em indivíduos sob restrição de sono, uma vez que esta condição ocasiona a elevação do primeiro e reduz o segundo (SPIEGEL *et al.*, 2004). Neste sentido, Spiegel *et al.* (2004) notaram em sua pesquisa randomizada com 12 homens saudáveis, onde estes voluntários foram submetidos a privação de sono por dois dias seguidos e sob controlada atividade física e ingesta de alimento, que o hormônio leptina estava aumentado em 18% e a grelina diminuída em 28%, quando comparados ao grupo controle. Também perceberam que os voluntários privados de sono tinham maior necessidade por ingesta de alimentos calóricos e com alta concentração de carboidratos.

Pesquisas em ratos também têm constatado que há uma influência similar do sono sobre a expressão gênica do Neuropeptídeo Y (NPY), que induz a fome, e da POMC, que através de seus muitos derivados eleva a sensação de saciedade, induzindo os animais a hiperfagia (KOBAN *et al.*, 2006). Neste âmbito, Koban *et al.* (2006) realizaram um trabalho

³ Que induz à fome.

⁴ Que induz à saciedade.

onde seus animais foram submetidos a privação parcial do sono por 20 dias. Suas metas eram entender o comportamento dos NPY e POMC, ditos mais potentes reguladores do comportamento alimentar. Assim sendo, eles notaram que sua intervenção, além do já conhecido efeito hiperfágico, levou os animais a obterem um aumento na expressão gênica do NPY e diminuição na expressão da POMC. Martins *et al.* (2010), também conduziram um estudo com ratos afim de verificar a relação entre hiperfagia e a liberação de NPY e Hipocretina em condição de privação total de sono por 96 horas. Os autores perceberam que após 24 horas de privação a expressão gênica destes neuropeptídios já estava aumentada. Eles também sugeriram que o estado de hiperfagia gerado por esta regulação dos neuropeptídios é uma consequência da perda de peso observada em períodos de privação de sono.

Com relação aos hormônios que exercem funções teciduais anabólicas e catabólicas, outras pesquisas com animais têm demonstrado que a privação total do sono paradoxal (PSP) é capaz promover reduções nas concentrações dos hormônios anabólicos, ao passo que hormônios catabólicos têm sua secreção potencializada. Assim, Andersen *et al.* (2005) verificaram que a concentração de testosterona total diminuiu 57% durante um período de privação de apenas 24 horas, acentuando-se ainda mais quando este período é estendido para 96 horas. Os autores então propuseram que este processo pode ocorrer devido a uma condição de hipogonadismo gerada pela privação, e isto pode levar a disfunção sexual e diminuição da libido em humanos, apesar de trabalhos com ratos não terem demonstrado tal comportamento. Por outro lado, Andersen *et al.* (2005) observaram que hormônios do estresse como a corticosterona e noradrenalina (NOR), os quais são essencialmente catabólicos, apresentaram o comportamento oposto: apenas 24 horas de privação foram capazes de elevar a concentração de corticosterona em 300%, enquanto a NOR apresentou um aumento de 400% após 96 horas de privação.

Estes aumentos na liberação de cortisol e corticosterona são sem dúvida uma das características mais marcantes da restrição de sono sobre os eixos endócrinos (HIPÓLIDE *et al.*, 2006). Existe uma gama de trabalhos que demonstram tais alterações (ANDERSEN *et al.*, 2005; HIPÓLIDE *et al.*, 2006; KOBAN *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2010). Hipólide *et al.* (2006), em seu trabalho, verificaram que ratos Wistar privados de sono por 96 horas obtiveram um aumento significativo nos hormônios adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona. Uma possível explicação para este acréscimo se deve à *up-regulation*⁵ da expressão gênica do fator liberador de corticotrofina (CRH), nos neurônios do núcleo

⁵ Supreregulação ou Regulação para cima – aumento fisiológico na expressão gênica de um componente celular devido a um estímulo externo.

paraventricular (PVN) do hipotálamo, que acontece concomitantemente à privação (KOBAN *et al.*, 2006).

Outro fator notável trata-se da concentração de IGF-1, um hormônio secretado de maneira predominante pelo fígado em resposta ao hormônio do crescimento (GH) e com propriedades anabólicas, parece ser subitamente reduzido em condições de privação de sono (EVERSON e CROWLEY, 2004). Com humanos, alguns estudos também vêm demonstrando prejuízos análogos em indivíduos com alterações no padrão de sono, onde os níveis dos hormônios GH e testosterona estão bastante reduzidos (GAMBINERI *et al.*, 2003; LUBOSHITZKY *et al.*, 2005). Assim sendo, ao agregar as alterações de testosterona, IGF-1, GH, cortisol (corticoesterona) e catecolaminas, deduz-se que a privação de sono contribui para o estabelecimento de um ambiente essencialmente catabólico no organismo. Desta maneira, Dattilo *et al.* (2012) conduziram um estudo afim de observar alterações na histomorfometria do músculo esquelético de ratos Wistar, divididos em três grupos: privados por 96 horas, privados por 96 horas seguido de descanso por 96 horas e grupo controle. Eles perceberam que a privação de sono, além dos já conhecidos efeitos de perda de peso, aumento na liberação da corticosterona, diminuição na testosterona, que a área de secção transversa das fibras do músculo Tibial Anterior dos animais estava notadamente reduzida, demonstrando que a privação de sono, de fato, gera atrofia muscular, e que talvez isto seja o maior responsável pela redução da massa corporal dos animais.

Outros trabalhos também têm verificado a influência da restrição de sono sobre os hormônios tireoideanos com o intuito de atribuir um possível “efeito antidepressivo” do fenômeno, devido às semelhanças sobre a modulação endócrina encontrada entre indivíduos com depressão e os privados de sono (BAUMGARTNER *et al.*, 1993; KUHS *et al.*, 1996). Assim, alguns trabalhos com humanos mostraram que a privação parcial do sono leva ao aumento na secreção do hormônio estimulador da tireóide (TSH), triiodotironina (T₃) e tiroxina (T₄), além de suas formas livres, nos dias seguintes à restrição. Neste sentido, Gary *et al.* (1996), utilizando de uma amostra de 12 indivíduos com privação total de sono por três dias (72 horas), verificaram que os níveis circulantes de TSH, T₃ e T₄ estavam substancialmente elevados. Kuhs *et al.* (1996), trabalharam com uma amostra de 13 pacientes que eram tratados com um antidepressivo específico, tentando encontrar este possível efeito terapêutico da restrição de sono. Ao longo de quatro semanas de tratamento os pacientes foram privados parcialmente de sono (PSD) por seis vezes, com um intervalo de cinco dias entre cada PSD. Verificaram então que os hormônios T₃ e TSH estavam significativamente elevados. Embora um corpo de evidências sustente a ideia que existe alterações no eixo

tireoideano com a privação de sono, a variação circadiana destes hormônios não parece ser afetada pela mesma, seja ela parcial ou total (BAUMGARTNER *et al.*, 1993).

Os mecanismos envolvidos nestas alterações do eixo tireoideano, bem como dos demais eixos endócrinos, ainda não estão bem elucidados. Todavia, é possível que a liberação de TSH seja influenciada pelo aumento concomitante do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) em condição de restrição de sono, enquanto que os hormônios tireoideanos sejam afetados principalmente pela elevação das catecolaminas e sua ação nos receptores B-adrenérgicos da tireóide, os quais a estimulam (BAUMGARTNER *et al.*, 1993).

A respeito do potencial antidepressivo da restrição de sono, Kuhs e Tolle (1991) sugeriram que este possível efeito, se existir, não persiste por muito tempo. Assim, Kuhs *et al.* (1996) não evidenciaram tal relação em seu trabalho, ao utilizar um protocolo de privação parcial com duração de quatro semanas em voluntários depressivos. Por outro lado, Baumgartner *et al.* (1993) encontraram melhoras significativas na qualidade de vida e sensação de bem estar das suas voluntárias saudáveis, as quais também foram privadas parcialmente, mas por um período de apenas três dias.

Com relação aos modelos animais, resultados acerca do tema têm apontado para direção oposta. Trabalhos com roedores envolvendo privação total do sono paradoxal (PSP) parecem conduzir a uma queda na liberação de T_3 e T_4 , enquanto o TSH se mantém ou se eleva (BERGMANN *et al.*, 1989; EVERSON e REED, 1995). Entretanto, Campo-Barros *et al.* (1993) observaram que seus animais, privados por um período de apenas 24 horas, obtiveram um grande aumento nos níveis de triiodotironina, mas não da tiroxina. Eles também notaram que a atividade da enzima 5-Iodotironinadeionidase tipo II, a qual converte T_4 em T_3 , estava substancialmente elevada, sugerindo ser esta a razão de seu achado.

Taxa Metabólica

Todo organismo vivo necessita de certa quantidade de energia necessária para manter suas funções básicas. A este conteúdo energético de um organismo em condição de jejum, repouso físico e mental e em um ambiente controlado denomina-se Taxa Metabólica Basal (TMB), a qual representa cerca de 60% a 70% do consumo energético diário e é comumente medida através da calorimetria direta, pelo cálculo do calor produzido pelo organismo, ou pela calorimetria indireta, utilizando a quantidade de oxigênio consumido (O_2) e de gás carbônico produzido (CO_2) (WARLICH e ANJOS, 2001).

Existem muitos fatores que influenciam a variação na TMB interindividual, como as características inerentes ao indivíduo - sexo, idade, dimensão corporal, composição corporal - e fatores controláveis, como atividade física prévia, ingestão alimentar, temperatura do ambiente, tabagismo e ciclo menstrual (CUNNINGHAM, 1991; WARLICH e ANJOS, 2001).

O principal determinante da TMB é a massa corporal magra, que consiste no músculo esquelético (pouco ativo no repouso), órgãos (muito ativos no repouso), água corporal, tecido conectivo e ossos (CUNNINGHAM, 1991; PIERS *et al.*, 1998; WEINSIER *et al.*, 1992). Jonhstone *et al.* (2005), entretanto, verificaram que há uma relação entre a massa de gordura corporal, bem como do hormônio tiroxina (apenas em homens), sobre a TMB. Esses autores encontraram que o tecido gordo é cinco vezes menos metabolicamente ativo no repouso do que o tecido magro, porém tem papel importante no gasto energético em tal condição, corroborando com antigos achados (WEINSIER *et al.*, 1992). Eles também perceberam que a concentração plasmática de repouso do hormônio tiroxina está relacionada à TMB de homens, porém, outros como a leptina e triiodotironina - os quais também desempenham funções importantes sobre o balanço energético - não apresentam mesma função. Em outras palavras, eles encontraram que tanto a quantidade de leptina como de T_3 circulantes não interferem no estado metabólico basal. Apesar destes achados, outros estudos têm demonstrado uma ligação entre hormônios tireoideanos e TMB (SVENDSEN, 1993). Mas, apesar de a massa corporal magra ser considerado o principal preditor da TMB, indivíduos com a exata mesma quantidade deste tecido podem não apresentar o mesmo gasto energético. Isto porque a atividade metabólica dos tecidos podem apresentar diferenças interindividuais (WEINSIER *et al.*, 1992).

Existem vários fatores e características individuais que influenciam a taxa metabólica basal, mas o principal determinante do estado metabólico do indivíduo é a glândula tireóide, através da liberação de seus hormônios T_3 e T_4 . São bem conhecidos os efeitos dos hormônios tireoideanos sobre o metabolismo do organismo. A concentração plasmática de T_4 ligada à proteína carreadora é cerca de 60 vezes maior do que o T_3 , no entanto, quase toda Tiroxina que entra nas células é transformada em Triiodotironina, a qual tem uma afinidade muito maior com os receptores intracelulares. Uma vez ligados, estes hormônios desencadeiam a transcrição gênica em larga escala e em quase todos os tecidos do corpo. O resultado é uma elevação generalizada do metabolismo, que pode aumentar até 100% em relação à taxa metabólica basal (TMB), dependendo da atividade da glândula tireóide (GUYTON e HALL, 1997).

Taxa Metabólica e Sono

O sono também conduz alterações importantes sobre a TMB. Muitos trabalhos têm observado uma variação na taxa metabólica durante o sono em humanos. Sabe-se que existe um declínio progressivo da taxa metabólica durante o sono até próximo da hora de acordar, quando o gasto energético volta a crescer (WEBB e HIESTAND, 1975; BONNET *et al.*, 1991; FONTVIEILLE *et al.*, 1994). Alguns autores sugerem que este declínio está relacionado à variação circadiana da temperatura corporal (WEBB e HIESTAND, 1975; FONTVIEILLE *et al.*, 1994).

A literatura também aponta uma relação entre os estágios do sono e o gasto energético durante o mesmo: a maior taxa metabólica acontece no sono REM, seguido do NREM estágios 1 e 2, e a mais baixa se mostra no sono de ondas lentas (BREBBIA e ALTSHULER, 1965; HASKELL *et al.*, 1981; FONTVIEILLE *et al.*, 1994). Isto pode ser devido à alta atividade neural durante o sono REM, visto que o cérebro é responsável por cerca de 20% do metabolismo basal (HASKELL *et al.*, 1981). Contudo alguns investigadores não encontraram tal relação. White *et al.* (1985) não evidenciaram variação significativa do gasto energético entre os estágios do sono, porém observaram boa relação entre a taxa metabólica e a ventilação em cada etapa. Webb e Hiestand (1975) notaram que não houve um aumento significativo do $\dot{V}O_2$ durante o sono REM quando comparado aos outros estágios do sono em uma amostra de 20 pessoas com idades entre 20 e 70 anos. Mas, apesar destes resultados contraditórios, parece haver um consenso na literatura a respeito da redução da taxa metabólica durante o sono com o avanço da idade, a qual pode estar relacionada à redução da TMB, mesmo levando em conta que pessoas idosas passam mais tempo no sono REM quando comparadas aos mais jovens (WEBB e HIESTAND, 1975).

Se por um lado se observa uma redução na taxa metabólica durante o sono, a falta deste também ocasiona alterações sobre a mesma. Está bem consentido na literatura que uma das características mais expressivas da privação de sono em animais é o comportamento hiperfágico que estes desenvolvem, além da perda de peso corpóreo e a elevação do estado metabólico (EVERSON e WEHR, 1993; RECHTSCHAFFEN *et al.*, 1995; BERGMANN *et al.*, 1995; KOBAN e SWINSON, 2005). Contudo, alguns estudos mostram que este é um comportamento estereotipado, pois já foi verificado através das migalhas deixadas que o animal consome menos do que se pensava (MARTINS *et al.*, 2011).

Mas o comportamento hiperfágico e a regulação hormonal do controle alimentar ocorrem de maneira similar em humanos e animais, apesar disto não ser refletido na massa

corporal de ambos os casos. Deve-se levar em conta que, tanto para humanos como animais, a privação de sono leva a busca por alimentos calóricos e com alta concentração de carboidratos. Neste sentido, Levin *et al.* (2000) conduziram uma pesquisa onde 24 ratos foram separados em dois grupos: dieta altamente calórica e normal. Ambos os grupos foram subdivididos em controle e “estressados”, estes últimos sendo submetidos a um protocolo específico capaz de promover estresse aos animais. Eles perceberam então que os animais sob alimentação rica em calorias tiveram menor aumento de corticosterona e menor expressão gênica do CRH. Além disso, os animais com alimentação altamente calórica, ao final do experimento, pesavam 26% a mais e consumiram 27% mais calorias em relação ao grupo de alimentação normal. Isto o fez sugerir que alimentos calóricos podem ajudar a amenizar uma situação de “stress”, refletindo na atenuada perda de peso.

Embora a privação de sono represente um estado estressor ao organismo, animais não têm a sua disposição uma grande variedade de alimentos. Desta forma, Martins *et al.* (2011) realizaram um trabalho onde ratos foram divididos em três grupos: controles, privados por 96h e privados por 96 horas com recuperação de 24 horas. Cada um destes grupos recebeu três tipos de alimentação: ração, dieta altamente calórica, dieta líquida. Eles encontraram que a dieta líquida é capaz de amenizar muitos dos “sintomas” atribuídos a privação de sono, em comparação aos outros tipos de dieta: os animais tiveram maior consumo alimentar e menor perda de peso. Os autores sugeriram que isto pode ser devido ao mais fácil acesso do alimento em relação aos outros.

Ainda não está claro se o aumento no gasto energético durante a privação se deve as próprias alterações metabólicas que esta gera ou a um aumento na necessidade por energia, mas é provável que seja devido a esta última (KLINGENBERG *et al.*, 2012). Pilcher *et al.* (1990), realizaram um estudo com seis ratos privados totalmente de sono, e observaram que a troca de um calorigênico (Noradrenalina) por outro (Adrenalina), não atenua o aumento na taxa metabólica nestes animais. Assim, eles sugeriram que este aumento no gasto energético se deve mais a demanda aumentada do organismo do que pelas próprias alterações metabólicas. Além disso, eles perceberam também que este aumento na taxa metabólica parecia estar associado à inabilidade do organismo em conter o calor corporal, sugerindo que esta demanda aumentada pode estar relacionada à manutenção da temperatura corporal.

Desta forma, muitos estudos têm verificado esta elevação na taxa metabólica basal, tendo sido sugerido que tal aumento se deve a tentativa do organismo em conter a temperatura corporal, levando em conta o estado de hipotermia gerado pela privação (RECHTSCHAFFEN *et al.*, 1995; BERGMANN *et al.*, 1995). Koban e Swinson (2005)

demonstraram que a taxa metabólica de repouso de ratos com 1 hora de restrição de sono durante 20 dias aumentou 166% em relação ao início do experimento. Em adição, eles também encontraram um aumento na expressão gênica da proteína UCP-1, que gera calor ao invés de ATP na membrana mitocondrial, sendo este um dos mecanismos atribuídos à elevação da taxa metabólica durante o período de restrição. Ainda neste âmbito, Koban *et al.* (2006) também sugeriram que o aumento da CRH concomitante à privação de sono está relacionado ao aumento da taxa metabólica, ao elevar a termogênese no tecido adiposo marrom de ratos.

O aumento do gasto energético durante a privação de sono pode ser considerado análogo a outros estados patológicos de hipermetabolismo, como o hipertireoidismo. Everson e Wehr (1993) sugeriram que este estado de metabolismo aumentado, além do próprio ambiente catabólico ocasionado pela restrição, gera um estado de “má-nutrição” devido ao acelerado *turnover*⁶ dos macronutrientes que ocorre no organismo de ratos em restrição de sono por período prolongado, e, desta forma, como no hipertireoidismo, a alta ingestão de alimentos e a perda de peso seriam consequências do elevado gasto energético. Assim, estes autores verificaram em seu experimento que se existe um aumento na ingestão calórica, quando a ingestão de proteínas está normalizada, os animais tendem a perder menos peso durante o período de restrição. Dados de Koban *et al.* (2006), suportam esta ideia, visto que os autores verificaram que o NPY, que tem sua expressão aumentada durante a privação de sono em ratos e o qual tem propriedades orexígenas, parece sofrer *up-regulation*⁷ em situações de balanço energético negativo, como acontece na condição mencionada.

Apesar dos achados com animais convergirem para o fato de que a privação de sono leva ao aumento na taxa metabólica, estudos com humanos parecem apontar para direção oposta. Existe um corpo de evidências que denotam a privação de sono como um potencial efeito *obesigênico*⁸. Apesar da alteração do controle central da fome e saciedade ser considerado o grande gerador do balanço energético positivo, outros fatores contribuem de forma bastante significativa com o fenômeno, como as diminuições no nível de atividade física e na taxa metabólica basal (KLINGENBERG *et al.*, 2012). Neste sentido, Buxton *et al.* (2012) notaram em seu estudo, uma notável redução da TMB de seus voluntários, quando foram privados parcialmente de sono por três semanas.

⁶ Processo constante de síntese e degradação de um macronutriente no organismo.

⁷ Regulação para baixo - diminuição fisiológico na expressão gênica de um componente celular devido a um estímulo externo.

⁸ Que induz à obesidade.

Embora os hormônios tireoidianos sejam conhecidos como os principais reguladores do estado metabólico do organismo, não existem muitos trabalhos que tentam criar uma ligação entre eles e o estado de metabolismo acometido pela privação de sono. Apesar de nossa base de dados apontar para um leque de estudos os quais demonstram que os hormônios da tireoide são notadamente modificados pela privação de sono em humanos (GARY *et al.*, 1996; KUHS *et al.*, 1996), ou algumas em animais (BERGMANN *et al.*, 1989; CAMPOS-BARROS *et al.*, 1993; EVERSON e REED, 1995), tais alterações não têm sido abordadas como potencial geradoras das mudanças na taxa metabólica observada. A maior parte dos estudos indica a termogênese do tecido adiposo marrom como o mecanismo principal de aumento na taxa metabólica verificada em ratos (BERGMANN *et al.*, 1989; BALZANO *et al.*, 1990). No entanto, a maior parte dos estudos ainda não desvendaram o real potencial do mesmo tecido em humanos adultos (CYPESS *et al.*, 2009).

Portanto, a literatura é clara quando se trata de privação de sono e taxa metabólica em ratos. Porém, afora o mecanismo termogênico explanado, ainda não se tem conhecimento de outros mecanismos responsáveis pela alteração na taxa metabólica basal em condição de restrição de sono. Desta forma, considerando seus efeitos fisiológicos, os hormônios tireoideanos poderiam exercer algum papel sobre o gasto energético de animais sob privação de sono.

Então, considerando que o balanço energético negativo, ocasionado devido ao estado de hipermetabolismo acometido pela privação do sono em animais, pode contribuir com o processo de perda de peso o qual é fortemente influenciado pelas alterações hormonais que levam ao processo de atrofia muscular, torna-se imprescindível explorar todas possíveis causas de tal alteração. Neste sentido, compreender o papel dos hormônios da tireóide sobre a taxa metabólica nesta condição se mostra fundamental.

Considerações e Problemática

Tive interesse em estudar mais sobre a área da psicobiologia e sono quando comecei a aprender sobre a neurociência, durante o início do curso de graduação. A partir de então realizei dois estágios curriculares no Centro de Estudos em Psicobiologia e Exercício (CEPE) em projetos que tinham como temática principal o comportamento, o sono e o exercício físico. Mas descobri de fato meu interesse em aprofundar meus estudos sobre assunto quando percebi, por experiência própria, o quanto a qualidade do sono afeta a vida de uma pessoa.

Assim, compreendo o quanto é importante considerar a relevância do sono nos processos cognitivos e físicos, pois se trata de uma ferramenta que ajuda a melhor entender a complexa rede dos processos mentais humanos que estão sempre interligados entre si e que repercutem sobre a condição física. No entanto, apesar de estudos que abordam sono, sua restrição ou privação e o exercício físico terem sido amplamente pesquisados nas últimas décadas, quando pensamos em mecanismos metabólicos e fisiológicos a respeito da mesma questão a literatura se mostra menos robusta. Portanto, identificar estes mecanismos e relacioná-los entre si e com os efeitos já bem divulgados na comunidade científica sobre o assunto pode levar a uma nova e mais completa compreensão acerca desta operação mental.

Se o sono tem implicações sobre a condição física do ser humano, então o Educador Físico também tem um papel neste processo. Conhecer mais a respeito o assunto, no caso a privação de sono, pode oferecer meios para que o profissional da Educação Física formule estratégias de intervenção na saúde, tendo em vista os processos metabólicos e fisiológicos positivos e bem conhecidos do exercício físico, para amenizar ou suprimir os efeitos deletérios que tal condição gera.

Desta forma, o estudo pode fornecer, não apenas ao Educador Físico, mas aos profissionais de saúde em geral, um instrumento para melhor atuar sobre a qualidade de vida das pessoas por meio da intervenção positiva no âmbito desta operação mental, à medida que a sociedade corriqueira atual tende a obstruir o processo e a favorecer o aparecimento de distúrbios do sono.

Diante do exposto, no presente trabalho tentamos responder as seguintes questões: Quais as alterações metabólicas, hormonais e histomorfométricas a privação total de sono paradoxal por 96 horas ocasiona em ratos machos Wistar? E quais as possíveis relações entre elas?

Logo, os objetivos do estudo foram:

- Verificar as alterações metabólicas, hormonais e histomorfométricas da privação total do sono paradoxal por 96 horas em ratos machos Wistar;
- Analisar as relações entre as variáveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo apresentou um procedimento de pesquisa experimental. Segundo Marconi e Lakatos (2010), este tipo de pesquisa pode ser desenvolvida tanto “em campo” como em laboratório e as técnicas e instrumentos de manipulação e observação do objeto de pesquisa devem ser específicos e precisos. Assim, o objetivo foi testar uma hipótese e, para este fim, foram adotados procedimentos técnicos rigorosos que envolvem a seleção de uma amostra específica, a adoção de grupos controle, além do experimental, e o controle do ambiente e das variáveis a serem manipuladas (MARCONI e LAKATOS, 2010).

A abordagem da pesquisa teve caráter quantitativo, que tem por fim registrar dados e informações de um grupo, permitindo que estes sejam quantificados, ou seja, deixando-os inteligíveis por meio de sua transformação em variáveis matemáticas (MINAYO e SANCHES, 1993). Além disso, nesta abordagem de pesquisa, as variáveis são controladas e pré-selecionadas, os instrumentos de análise são aqueles validados pela literatura e os resultados são apresentados em forma de números, os quais servem para a comparação com outros estudos quantitativos (TURATO, 2005).

2.1 Animais experimentais e condições ambientais

Foram utilizados durante o estudo, 40 ratos machos da linhagem Wistar (10 por grupo), com três meses de idade e pesos entre 300-350 gramas, os quais foram mantidos no biotério do Departamento de Psicobiologia, provenientes da colônia do CEDEME da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP. Os animais experimentais foram mantidos até o início do experimento, sob as seguintes condições: ciclo claro/escuro 12:12h, cuja iluminação iniciou-se às 7h, em uma sala com a temperatura controlada (22 ± 2 °C), com água e ração *ad libitum*.

Os animais experimentais foram mantidos durante a fase de desenvolvimento em grupos de 4-6 animais, em caixas de polipropileno brancas (31x38x16,5cm) e tampas de aço inox com recuos para o fornecimento de água e ração, sendo manipulados apenas para a limpeza da forração da mesma. Para a formação das caixas moradias foram utilizados maravalha de sabugo de milho, trocada seis vezes por semana, no período da manhã, pelos técnicos do laboratório.

2.2 Cuidados éticos para com os procedimentos experimentais

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos por pessoal treinado, estando de acordo com o Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals - National Research Council, NIH Publication N^o 85-23, revised 1996*), e com protocolos de uso e eutanásia de animais “princípios de cuidados com animais de laboratório” (*Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research, 2003*). O projeto teve aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo / Hospital São Paulo, sob protocolo número 0764/10.

2.3 Protocolos Experimentais e Procedimentos

Composição de Grupos Experimentais:

1. Grupo Controle (CTRL) - Não sofreu nenhum tipo de intervenção;
2. Grupo Privação de Sono Paradoxal por 96 horas (PSP96h) – Foi submetido a um protocolo de privação de sono paradoxal por 96h, sendo eutanasiado imediatamente após a intervenção;
3. Grupo Metabolismo e Privação de Sono Paradoxal (MET/PSP96h) – Foi submetido a um protocolo de avaliação do metabolismo antes e após a privação do sono paradoxal por 96h;
4. Grupo Sham (SHAM) - Foi submetido a um protocolo de medida do metabolismo, mas não foi privado de sono.

Obs: Os grupos foram distribuídos considerando a massa corporal total.

Privação de Sono Paradoxal

A privação seletiva de sono paradoxal foi realizada pelo método modificado das plataformas múltiplas (SUCHECKI e TUFIK, 2000), que consiste em alojar até dez animais sobre 14 plataformas circulares e estreitas de 6,5cm de diâmetro espaçadas por cerca de 10 cm umas das outras, submersa em água em um tanque de aço inox (123 cm de comprimento x 44 cm de largura x 44 cm de altura). O nível da água fica a um centímetro abaixo da superfície, e os animais são obrigados a permanecer nas plataformas; ao iniciar o sono paradoxal, podem cair na água, devido à atonia muscular que acompanha essa fase do sono, sendo então acordados. Os animais foram privados por 96h. Antes do procedimento de privação

propriamente dito, os animais foram adaptados ao tanque de privação por 2-3 dias seguidos por 1 hora, para serem treinados nas mesmas condições experimentais.

Figura A: Tanque de Privação de Sono Paradoxal



Avaliação Metabólica

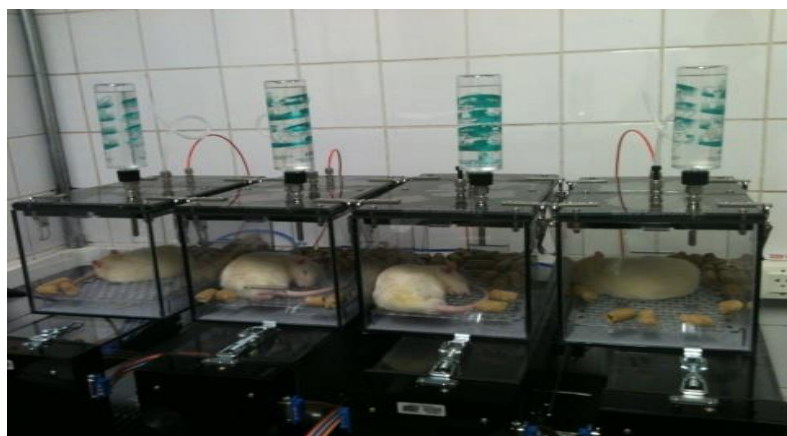
O metabolismo dos animais foi determinado por meio de um sistema metabólico de calorimetria indireta (Oxymax open-circuit calorimeter- Columbus Instruments, Ohio- USA) que foi calibrado antes de cada teste utilizando uma mistura de gases conhecidos (20,5% O₂ e 0,5% CO₂) conforme descrito por Kennedy *et al.* (2007). Os dados foram coletados em intervalos regulares de 15s; os valores de consumo de oxigênio (O₂) e produção de dióxido de carbono (CO₂) foram utilizados para determinação do coeficiente respiratório- QR (razão entre O₂/ CO₂. (ml.kg.min⁻¹), que por sua vez foi utilizado pelo software do equipamento para identificar a taxa metabólica basal. Todo o procedimento foi conduzido de forma contínua, por um intervalo de 24 horas, compreendendo o período claro e escuro (Oxymax Windowns Software v 4.59). As análises foram realizadas com auxílio do software CLAMS Examination Tool (CLAX v2.2.1, Columbus Instruments, Ohio- USA).

Tal medida permitiu um melhor acompanhamento dos efeitos da privação de sono paradoxal, com medida basal (pré), bem como imediatamente após a realização do protocolo de privação de sono paradoxal (medida final). Neste protocolo foram monitorados a quantidade de água, comida bem como a produção de excrementos produzidos no intervalo de coleta. Como limitação do método, não foi possível monitorar a temperatura corporal dos animais bem como a produção de urina.

Figura B: Analisador de Gases montado para experimento .



Figura C: Analisador de Gases montado para experimento (posicionado com os animais de experimentação).



Coleta e Análises Sanguíneas

A eutanásia dos animais foi realizada por decapitação (Guilhotina com lâmina em aço inoxidável 420 e base em polipropileno com medidas de base: 300mm x 300mm; Altura: 22mm; Facas Abertas: 170mm de altura; Altura de cada faca: 73mm; Espaço ocupado

durante o trabalho: 400mm de altura com as facas abertas e 500mm de altura com as facas fechadas), um procedimento de morte rápida, inconsciente e livre de dor, aceito para roedores quando o propósito é a obtenção dos tecidos e sangue livres de contaminação por agentes químicos (AVMA, 2001). O sangue foi coletado em tubo Vacutainer[®] seco ou com anticoagulante específico, que foi centrifugado para retirada de soro/plasma e armazenado em freezer -80°C até que as dosagens pudessem ser realizadas.

As análises realizadas neste estudo foram: IGF-1, Corticosterona, Testosterona Total, T₃ e T₄L. Abaixo listamos os métodos utilizados para cada uma das dosagens realizadas:

Testosterona Total - Análise realizada através do equipamento *Unicell DXI 800*[®] fabricado pela empresa *Beckman Coulter*[®]. O método de análise trata-se de um imunoensaio quimioluminescente, com limite de detecção mínima de aproximadamente 10 ng/dL das concentrações de testosterona total.

IGF-1 (Fator de crescimento do Tipo Insulínico)- Dosagem realizada por meio de técnica de ensaio enzimático imunoenzimático (ELISA) por imunoquimioluminescência. Para essa análise foi utilizado o Kit comercial ELISA USCN Life Science Inc.

Corticosterona - As concentrações de corticosterona foram mensuradas pelo método de radioimunoensaio (RIA), usando kit comercialmente disponível (MP Biomedicals).

Hormônios da Tireóide (T3 e T4) - As concentrações destes hormônios foram realizadas por meio de ensaio imunométrico de quimioluminescência (Advia Centaur, Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA).

Histologia e área de secção transversa

Após a eutanásia dos animais, o músculo *Tibialis anterior* da pata traseira esquerda (CTRL x PSP96h) foi cuidadosamente dissecado e pesado. Para controle do peso deste músculo, a Tíbia foi retirada e medida. O fragmento muscular distal foi posicionado envolto por massa composta de leite em pó e tissue tek[®], de modo a fornecer, durante a microtomia, cortes transversais. Após o posicionamento, as amostras foram imediatamente resfriados em isopentano por 20 segundos, congelados a seguir em nitrogênio líquido (N₂) e armazenados em freezer -80° C até que os cortes histológicos fossem realizados.

Cortes seriados de 10 µm foram obtidos em criostato (Leica Microsystems-CM1850), à temperatura de -22°C, coletados em lâminas de vidro silanizadas. Para análise

morfológica foi utilizada coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), esses cortes histológicos foram avaliados por microscopia de luz (microscópio Axioplan 2 Zeiss).

Imagens digitais de cortes foram feitas em três a quatro campos dos músculos de cada animal usando um microscópio Olympus BX50 brightfield e uma câmera DP71 (Melville, NY) com uma objetiva com aumento de 40x. As análises da área de secção transversa das fibras musculares foram realizadas de forma cega, sendo contados 300 fibras por músculo, procedimento este realizado com auxílio do software Axio Vision 4.6 software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

Coletas Complementares

Como complemento ao estudo, as adrenais, o fígado e o baço dos animais foram retirados, dissecados e pesados. Além desses tecidos, a gordura Retroperitoneal e Epididimal também foi retirada e pesada. Estes dados contribuem com a interpretação das mudanças encontradas em relação ao metabolismo, uma vez que a privação de sono pode interferir do peso desses tecidos.

Ração Ofertada aos Animais Durante o Experimento

Durante todo o experimento os animais receberam ração e água *ad libitum*. A ração foi ofertada em forma de pelets contendo Vitaminas, Minerais, Aminoácidos e Anti-oxidantes. Neste estudo foi utilizada a ração Nuvilab® Alimento Completo, que é composta por: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

A cada quilograma de ração, são encontrados: Umidade (Max.)= 125g/kg; Matéria Mineral (Max.)= 90g/kg; Cálcio (min-max.)= 10-14g/kg; Proteína Bruta (min)220g/kg; Matéria Fibrosa (Max.) 70g/kg; Fósforo (min.)= 8.000mg/kg; Extrato Etéreo (min.)= 40g/kg.

Abaixo apresentamos um quadro com as especificações da ração:

Nuvilab® CR1 Alimento Completo			
	Nutriente	Quantidade por KG	Valor Energético (Kcals)
Vitaminas	Vitamina A	13ml	0
	Vitamina D3	2ml	0
	Vitamina E	30ul	0
	Vitamina K3	3mg	0
	Vitamina B1	5mg	0
	Vitamina B2	6mg	0
	Vitamina B6	7mg	0
	Vitamina B12	22ug	0
	Niacina (B3)	60mg	0
	Ácido Pantotênico (B5)	20mg	0
	Ácido Fólico (B9)	1mg	0
	Biotina	0,05mg	0
	Colina	1900mg	0
Minerais	Sódio	2700mg	0
	Ferro	50mg	0
	Manganês	60mg	0
	Zinco	60mg	0
	Cobre	10mg	0
	Iodo	2mg	0
	Selênio	0,05mg	0
	Cobalto	1,5mg	0

	Flúor	80mg	0
	Cálcio	14g	0
	Fósforo	8g	0
Aminoácidos e Antioxidantes	Lisina	12g	0
	Metionina	4000mg	0
	BHT (antioxidante)	100mg	0

2.4 Análise Estatística

A análise dos dados colhidos foi realizada com auxílio do programa Statistica versão 7.0. Os dados foram analisados por meio de uma Análise de variância (ANOVA) utilizando o teste Duncan como post-hoc, ou teste T para amostras independentes quando necessário. Para todas as análises, o nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$ e os dados estão apresentados em média \pm erro-padrão.

3. RESULTADOS

Quando os grupos CRTL e SHAM foram comparados não encontramos diferenças significativas, sugerindo que o protocolo de medida de metabolismo basal não prejudicou os animais em nenhuma das análises conduzidas. Dessa forma, o grupo CRTL foi suprimido, apresentado apenas os grupos SHAM e PSP96h.

Na tabela 1 apresentamos os dados referentes ao delta da massa corporal total, massa muscular e área de secção transversa do músculo *Tibialis anterior*. O delta da massa muscular revelou que o grupo PSP96h apresentou um declínio significativo desta variável em relação ao grupo SHAM ($t=13,65$). Quando a massa muscular em miligramas e o peso corrigido pelo tamanho da Tíbia dos grupos foram comparados, encontramos que o grupo PSP96h apresentou menor massa quando comparado ao grupo SHAM ($t=4,18$; $t=4,15$; respectivamente). A área de secção transversa da fibra muscular do *Tibialis anterior* apresentou uma importante redução no grupo PSP96h ($t=3,46$) e, relação ao grupo SHAM, demonstrando que a falta do sono causou atrofia muscular.

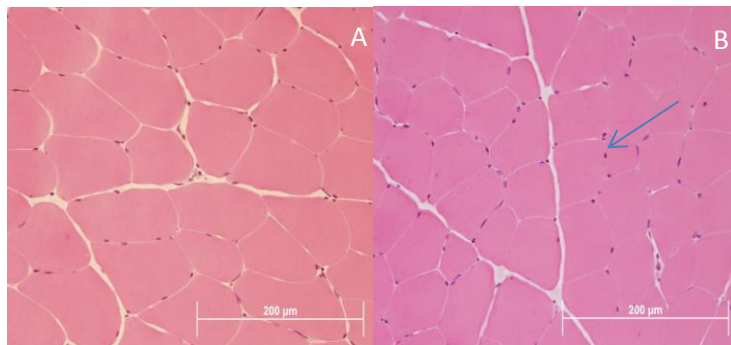
Tabela 1- Delta de massa corporal, massa muscular e área de secção transversa do músculo *tibialis anterior*.

Variáveis	SHAM	PSP-96h	P
Delta da massa corporal (g)	1,29 ± 1,60	-39,71 ± 2,54	<0,001*
<i>Tibialis anterior</i> (mg)	0,73 ± 0,03	0,60 ± 0,02	0,01*
<i>Tibialis anterior</i> / <i>Tibia</i> (mg/mm)	16,80 ± 0,56	14,02 ± 0,37	0,01*
Área de secção transversa (μm^2)	4123,74 ± 180,10	3118,52 ± 227,64	0,004*

* Teste T para amostras independentes, resultados significativos para $p \leq 0,05$. Dados apresentados em média ± erro padrão.

Em relação à histomorfometria do músculo *Tibialis Anterior* do grupo SHAM e PSP96h (Figura 1), os cortes foram corados com HE e as fotos foram tiradas com objetiva de 40X. Podemos perceber que mesmo com um quadro de atrofia muscular, os cortes revelam integridade das fibras musculares e núcleos (figura 1B). Não foram observados infiltrados celulares.

Figura 1- Histomorfometria do Músculo *Tibialis Anterior*



(A) Imagem histológica de um corte transversal do músculo tibial anterior de um animal do grupo SHAM.
(B) Imagem histológica de um corte transversal do músculo tibial anterior de um animal do grupo PSP96h.

Na tabela 2 apresentamos os dados referentes ao comportamento da massa corporal total dos animais durante o período de privação de sono paradoxal. Quando os grupos foram comparados encontramos redução da massa corporal no grupo PSP96h a partir de 48h de privação de sono.

Tabela 2- Comportamento da Massa Corporal Total Durante o Período de Privação de Sono Paradoxal.

Variáveis	CRTL	PSP96h	P
Massa Corporal Basal (g)	384,29 ± 17,77	371,71 ± 9,41	0,54
Massa Corporal PSP24h (g)	386,71 ± 17,13	351,71 ± 9,75	0,10
Massa Corporal PSP48h (g)	384,43 ± 17,02	343,14 ± 10,26	0,06*
Massa Corporal PSP72h (g)	384,86 ± 16,30	336,00 ± 10,04	0,03*
Massa Corporal PSP96h (g)	385,57 ± 16,65	332,00 ± 10,52	0,02*

* Teste T para amostras independentes, resultados significativos para $p \leq 0,05$. Dados apresentados em média ± erro padrão.

No Gráfico 1 apresentamos novamente os dados referentes ao comportamento da massa corporal total, no entanto considerando as diferenças intragrupo. A ANOVA revelou que o grupo PSP96h apresentou redução significativa da massa corporal total a partir de 24 horas de privação de sono, sendo esta redução significativa ao longo do tempo, persistindo até o término do protocolo de investigação.

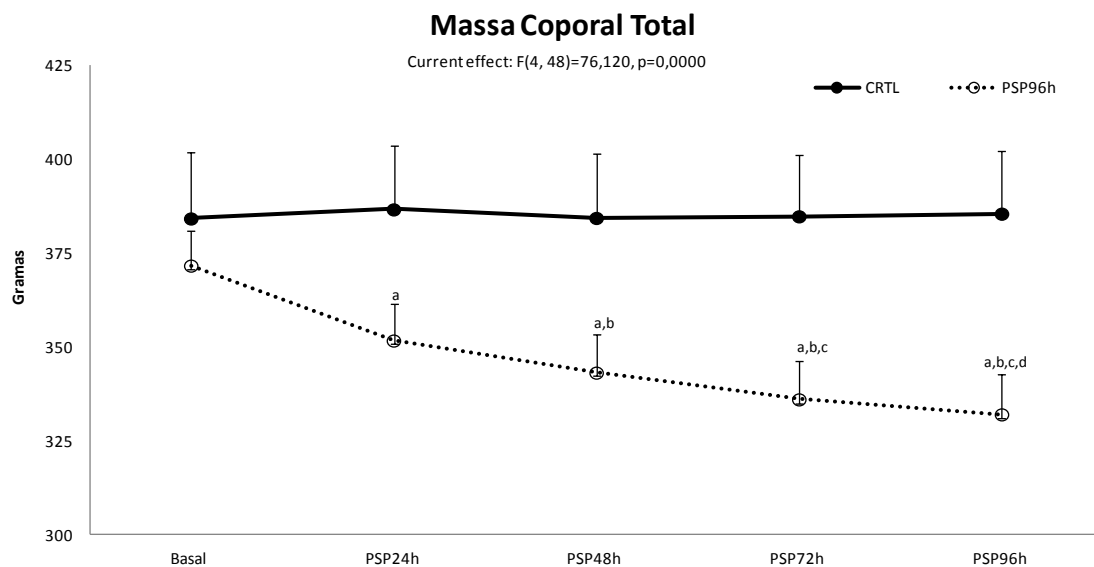


Gráfico 1- Anova para medidas repetidas utilizando post hoc Duncan Test. Dados apresentados em média \pm erro padrão. ^aDiferente do momento Basal, ^bDiferente do momento PSP24h, ^cDiferente do momento PSP48h, ^dDiferente do momento PSP72h, resultados significativos para $p \leq 0,05$.

Na tabela 3, apresentamos os resultados encontrados na determinação do Metabolismo Basal dos animais privados de sono paradoxal e do grupo SHAM. A Análise de variância encontrou diferenças significativas para os seguintes fatores: Interação dos dados ($F_{(1,11)} = 2930,892$; $p \leq 0,001$); o fator grupo ($F_{(1,11)} = 20,527$; $p \leq 0,0008$) e o fator tempo ($F_{(1,11)} = 311,384$; $p \leq 0,001$).

O comportamento do Volume de O_2 no Período Claro na condição Basal, não se mostrou diferente entre os grupos, no entanto, para o grupo MET/PSP96h, observamos diferenças intra ($p = 0,000065$) e intergrupos ($p = 0,00009$), em que esta variável apresentou aumento na condição Pós privação de sono. De forma similar, esta mesma variável, mas no período Escuro, apresentou o mesmo comportamento, com diferenças observadas na interação entre os dados ($F_{(1,11)} = 4302,781$; $p \leq 0,001$); no fator grupo ($F_{(1,11)} = 215,680$; $p \leq 0,002$) e no fator tempo ($F_{(1,11)} = 36,518$; $p \leq 0,001$). O grupo MET/PSP96h, apresentou diferenças intra

($p=0,000072$) e intergrupos ($p=0,000068$), em que esta variável apresentou aumento na condição Pós privação de sono.

Quando analisamos o Volume de O_2 considerando o período de 24 horas, as variáveis também apresentaram o mesmo tipo de comportamento, com significância para Interação entre os dados ($F_{(1,11)}= 4319,163$; $p<=0,001$); para o fator grupo ($F_{(1,11)}= 21,762$; $p<=0,0006$) e fator tempo ($F_{(1,11)}= 109,680$; $p<=0,001$).

Tabela 3- Determinação do Metabolismo Basal por medida do volume de oxigênio

Variáveis	SHAM	MET/PSP96h	
		Basal	Pós Privação
Volume de O_2 Período Claro ($ml.kg.min^{-1}$)	20,08 \pm 1,39	19,08 \pm 1,41	28,41 \pm 1,84*#
Volume de O_2 Período Escuro ($ml.kg.min^{-1}$)	23,92 \pm 1,84	23,81 \pm 0,88	30,17 \pm 1,99*#
Volume de O_2 24 horas ($ml.kg.min^{-1}$)	22,00 \pm 1,48	21,43 \pm 0,84	29,29 \pm 1,86*#

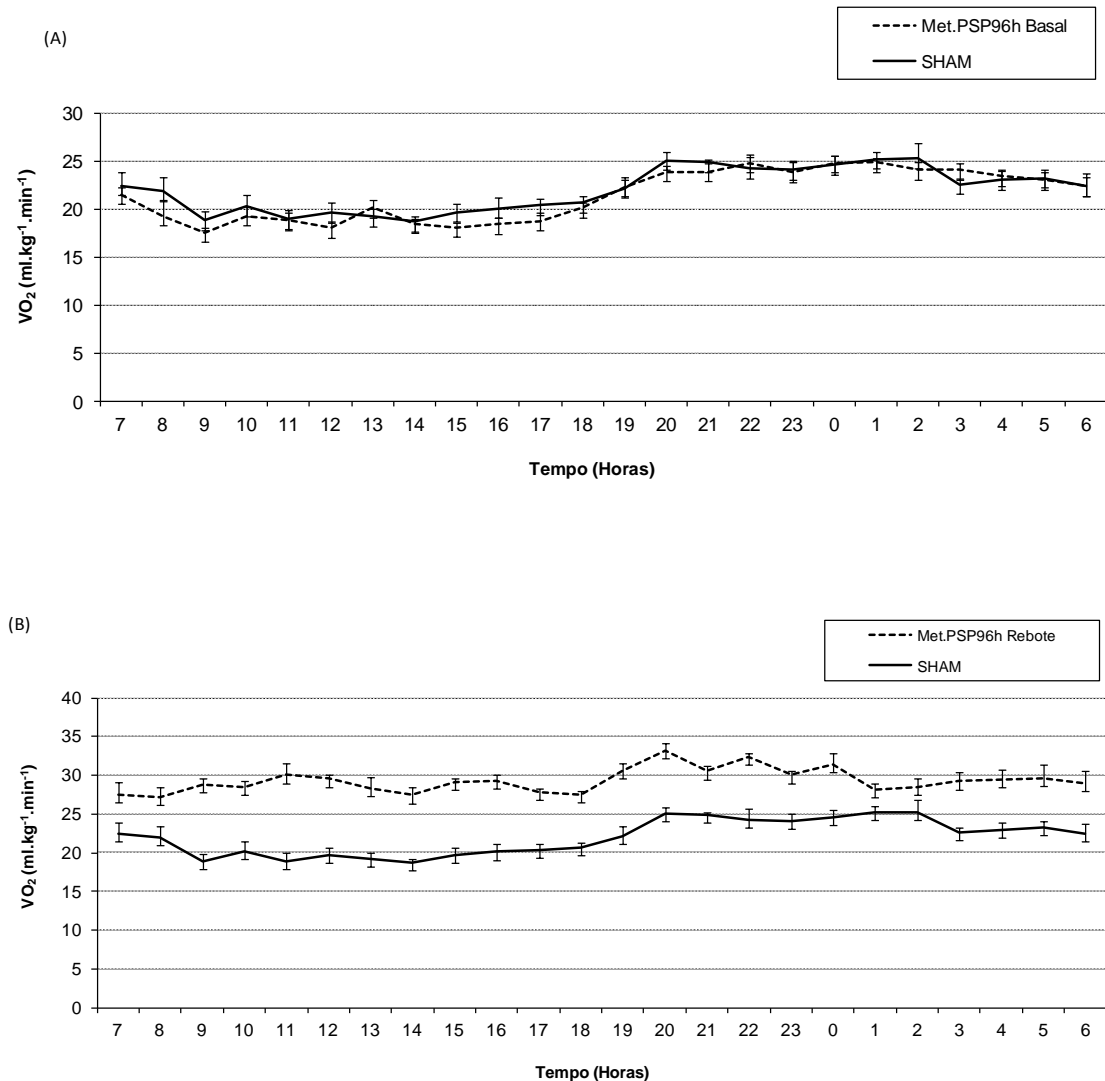
Anova para medidas repetidas utilizando post hoc Duncan Test. Dados apresentados em média \pm erro padrão.

*Diferente do Grupo SHAM, # Diferente do Grupo MET/PSP96h no momento basal, resultados significativos para $p \leq 0,05$.

No Gráfico 2 apresentamos o comportamento do metabolismo basal compreendido no intervalo de 24 horas. Na figura A, apresentamos o comportamento desta variável para os grupos MET.PSP96h e SHAM. Podemos observar que ambos os grupos apresentam comportamentos similares, sendo o metabolismo basal aumentado no período escuro em relação ao período claro. Já na figura B, apresentamos o comportamento da mesma variável, após a realização do protocolo de privação de sono paradoxal. Observamos que o grupo privado de sono apresentou valores do metabolismo basal aumentados em todos os períodos do dia (claro e escuro). Destaca-se que a média do metabolismo basal no período claro observado no grupo MET.PSP96h apresenta valores elevados quando observados os mesmos valores para o grupo SHAM no período escuro, pois percebemos que durante o

primeiro período os animais se encontram e maior atividade locomotora em relação ao segundo.

Gráfico 2- Comportamento do Metabolismo Basal no período de 24 horas



Na tabela 4 apresentamos os dados dos hormônios coletados para os grupos SHAM e para o grupo PSP96h. Com intuito de ampliar nosso poder de análise, acrescentamos as análises sanguíneas do grupo MET.PSP96h, para obtermos os dados dos hormônios na situação de “rebote”. Esse grupo foi submetido ao protocolo de privação de sono paradoxal por 96h e, ao término deste, foi permitido ao animal dormir por um período de 24 horas.

Em relação aos níveis de testosterona, encontramos interação entre os dados ($F_{(1,24)} = 125,8921$; $p < 0,001$), onde os níveis de testosterona estiveram menores no grupo

PSP96h quando comparados ao grupo SHAM ($p=0,05$) assim como no grupo Rebote no mesmo tipo de comparação ($p=0,04$). Para as concentrações de T3, encontramos interação dos dados ($F_{(1,24)} = 417,0503$; $p \leq 0,001$), onde as menores concentrações foram encontradas no grupo Rebote em relação ao grupo PSP96h ($p=0,03$). Já para as concentrações de T4, encontramos interação entre os dados ($F_{(1,24)} = 216,1421$; $p \leq 0,001$), quando os grupos foram comparados, encontramos diferenças do grupo PSP96h ($p=0,05$) e Rebote ($p=0,03$) em relação ao grupo SHAM. Para as análises de IGF-1, não foi possível realizar as dosagens do grupo Rebote, mas para os grupos analisados, encontramos menores concentrações deste hormônio no grupo PSP96h quando comparado ao grupo SHAM ($p=0,05$). Por fim, encontramos maiores níveis de corticosterona no grupo PSP96h em relação ao grupo SHAM ($p=0,05$) com recuperação no Rebote ($p=0,05$).

Tabela 4- Resposta Hormonal

Hormônios	SHAM	PSP96h	REBOTE
Testosterona Total (ng/dL)	244,09 \pm 25,72	148,10 \pm 10,88*	199,16 \pm 31,32*
T3 (ng/dL)	58,59 \pm 4,52	64,72 \pm 4,51	48,84 \pm 5,55#
T4 (ng/dL)	6,51 \pm 0,78	5,02 \pm 0,44*	4,40 \pm 0,46*
IGF-1 (pg/mL)	274,07 \pm 4,72	160,29 \pm 3,79*	-----
Corticosterona (ng/mL)	101,43 \pm 29,55	424,14 \pm 103,11*	78,29 \pm 32,56#

Anova one-way utilizando post hoc Duncan Test. Dados apresentados em média \pm erro padrão.

*Diferente do Grupo SHAM, # Diferente do Grupo PSP96h, resultados significativos para $p \leq 0,05$.

Na Tabela 5 apresentamos os resultados referentes ao consumo de ração, consumo de água e produção de fezes dos animais. Em relação à quantidade de ração consumida, não foram encontradas diferenças entre os grupos e nem quando comparado à condição basal e após privação do sono. Esses dados demonstram que os animais mantiveram seu padrão alimentar na condição de pós-privação de sono onde o metabolismo foi avaliado (Rebote de Sono).

Em relação à produção de migalhas, encontramos diferenças significativas com interação entre os dados ($F_{(1,11)} = 71,54486$; $p \leq 0,000004$); para o fator grupo ($F_{(1,11)} = 7,96960$; $p \leq 0,01$) e fator tempo ($F_{(1,11)} = 11,35469$; $p \leq 0,006$). O grupo SHAM não foi diferente do Grupo MET/PSP96h na condição Basal, mas este mesmo grupo apresentou aumento na produção de migalhas após a privação de sono, sendo diferente do SHAM ($p = 0,0009$) e da sua condição Basal ($p = 0,0004$).

Embora as fezes dos animais tenha sido coletada, infelizmente tivemos problemas na separação das mesmas em relação às amostras do grupo SHAM e do Basal do grupo MET/PSP96h, o que inviabilizou qualquer tipo de descrição e análise desta variável, implicando em uma limitação do nosso estudo.

Tabela 5- Consumo de Ração, Água e Produção de Fezes durante o Protocolo de Metabolismo

Variáveis	SHAM	MET/PSP96h	
		Basal	Pós Privação
Ração Consumida (g)	21,70 \pm 1,47	19,25 \pm 1,92	18,80 \pm 2,88
Água Consumida (ml)	25,00 \pm 2,24	24,29 \pm 2,97	43,14 \pm 5,25*#
Migalhas secas (g)	1,29 \pm 0,24	1,19 \pm 0,29	3,99 \pm 0,69*#
Fezes secas (g)	-----	-----	3,41 \pm 1,01

Anova para medidas repetidas utilizando post hoc Duncan Test. Dados apresentados em média \pm erro padrão.

*Diferente do Grupo SHAM, # Diferente do Grupo MET/PSP96h no momento basal, resultados significativos para $p \leq 0,05$.

Na Tabela 6 apresentamos os resultados do peso de diferentes tecidos. Quando os grupos foram comparados, encontramos diferenças significativas em todos os tecidos analisados. O grupo de animais que foram privados de sono apresentaram menores pesos no Fígado Úmido ($t = 5,06$); Baço Úmido ($t = 4,26$); Gordura Epididimal ($t = 2,26$); Gordura Retroperitoneal ($t = 5,79$) e maiores valores no peso das adrenais ($t = -2,37$). Quando os dados

foram analisados levando em consideração a peso corporal dos animais, com exceção do Baço e da Gordura Epididimal, as outras variáveis apresentaram o mesmo comportamento.

Tabela 6- Peso de Tecidos

Variáveis	SHAM	PSP96h	P
Fígado Úmido (g)	13,16 ± 0,70	9,11 ± 0,39	0,0004*
Fígado /Peso Corporal	33,47 ± 0,60	26,89 ± 0,52	0,00001*
Baço Úmido (g)	0,72 ± 0,03	0,54 ± 0,03	0,001*
Baço/ Peso Corporal	1,83 ± 0,07	1,61 ± 0,09	0,07 (ns)
Adrenais (g)	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,03*
Adrenais / Peso Corporal	0,14 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,003*
Gordura Epididimal (g)	4,72 ± 0,50	3,30 ± 0,39	0,04*
Gordura Epididimal / Peso Corporal	12,17 ± 1,42	9,66 ± 0,91	0,16 (ns)
Gordura Retroperitoneal (g)	5,36 ± 0,61	1,64 ± 0,21	0,0001*
Gordura Retroperitoneal / Peso Corporal	13,56 ± 1,22	4,81 ± 0,53	0,00006*

* Teste T para amostras independentes, resultados significativos para $p \leq 0,05$. Dados apresentados em média ± erro padrão. Legenda: ns- Não significante.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, procuramos identificar a influência da privação de sono paradoxal por 96 horas sobre os metabolismo e fatores que o influenciam, em ratos machos Wistar. Notamos que, de maneira geral, o metabolismo animal é ligeiramente prejudicado e influencia outros processos deletérios no organismo. Assim, a privação de sono paradoxal foi capaz de alterar o metabolismo basal dos animais, a regulação hormonal, bem como desencadear a redução da massa corporal devido à alteração em diversos tecidos.

Partindo do ponto de vista macroscópico, nosso trabalho revelou que a privação de sono é capaz de promover a perda de peso significativa em animais. Esta perda de peso pode estar associada à inabilidade do organismo animal em metabolizar adequadamente os nutrientes provindos da dieta, na situação de privação de sono, como propôs Everson e Wehr (1993). Além disso, nossos resultados também mostram que o consumo de ração não foi diferente entre os grupos de animais que foram privados de sono e o controle o que confirma a proposição de Everson e Wehr (1993). Isso porque, apesar do consumo alimentar dos animais ser o mesmo, àqueles privados perderam peso.

Outra evidência ainda neste mesmo âmbito foi observada por Hipólide *et al.* (2006) em ratos privados de sono, os quais notaram que os animais aproveitavam menos a energia dos alimentos para a manutenção do organismo, apresentando um baixo *Gross food efficiency*⁹. Todavia, é possível que se o tipo de alimento fornecido aos animais fosse diferente, os mesmos poderiam ter sofrido menos com este fator nutricional e a perda de peso, como demonstrou Martins *et al.* (2011) ao realizarem um estudo envolvendo privação de sono e três tipos diferentes de dietas fornecidas a ratos Wistar, onde os animais alimentados com uma dieta líquida obtiveram pouca diminuição no peso em comparação a uma dieta normal (ração) e outra rica em gorduras.

A literatura já apontou fortemente que uma das principais características apresentadas por ratos privados de sono é o seu comportamento hiperfágico. Sabe-se que a o estresse leva tanto humanos como animais a busca de alimentos com alto teor calórico. Desta forma, não seria surpreendente encontrarmos resultados que comprovassem esta teoria, corroborando com o achado de Everson e Wehr (1993), onde demonstraram que seus animais privado de sono, de fato, apresentavam hiperfagia. Porém, nossos dados de ingestão de ração e produção de migalhas demonstraram que, na verdade, tantos os animais privados de sono

⁹ Eficiência com que o organismo absorve e utiliza os nutrientes do alimento.

como os do grupo controle consomem uma quantidade muito semelhante do alimento. No entanto, o grupo privado de sono apresentou maior produção de migalhas. Assim, nossos dados corroboram com os de Martins *et al.* (2011), onde demonstram que os ratos submetidos à privação de sono desenvolvem um comportamento nervoso refletido no ato de roer, mas não ingerir, a ração.

Além da incapacidade em metabolizar o alimento, a redução da massa corporal também parece estar associada à atrofia de diversos tecidos do organismo. Nossos resultados demonstraram que, exceto a glândula adrenal, todos os outros tecidos analisados têm seu peso diminuído após a privação de sono. Isto está de acordo como estado metabólico apresentado em tal situação, pois é possível que com o metabolismo elevado o organismo necessite retirar energia de todos os tecidos do corpo. No entanto, a glândula adrenal sofre hipertrofia devido à sua alta atividade durante o período de privação, pois como já está bem estabelecido, em situações estressantes o aumento na produção de hormônios do estresse aumenta, tal como a privação de sono. Outro fator importante diz respeito à diminuição da massa muscular que acompanha o estado de privação de sono e a perda de peso. Este achado pode ser mais bem entendido ao se observar o decréscimo no peso dos músculos *Tibialis anterior* dos animais, além da redução na área de secção transversa. Este é um importante indicador de perda de funcionalidade, à medida que a diminuição da área de secção transversa do músculo está diretamente relacionada à diminuição da força. Se pensarmos que esta condição de privação de sono pode ser análoga à situação de trabalhadores noturnos e com pouco tempo de descanso, podemos cogitar então que esta é uma potencial área de intervenção dos profissionais da saúde, principalmente aqueles que lidam diretamente com o movimento corporal, como Educadores Físicos e Fisioterapeutas, ao fornecerem estratégias para manutenção ou ganho da massa muscular.

A atrofia muscular pode ter relação com diversos fatores, como nutricional e metabólico, mas talvez a maior delas seja a forte influência dos eixos hormonais. A privação de sono, em nosso estudo, foi capaz de alterar drasticamente a regulação de alguns hormônios que participam desde quadro de redução da massa muscular. Os resultados revelaram que hormônios essencialmente atróficos estão aumentados enquanto outros anabólicos estão reduzidos no organismo do animal. Desta forma, a Corticoesterona demonstrou um notável aumento no sangue dos animais que sofreram privação de sono, ao passo que a testosterona e IGF-1 apresentaram o comportamento oposto. Estas evidências estão de acordo a uma gama de trabalhos que apontam para esta mesma direção (ANDERSEN *et al.*, 2005; DATTILO *et al.*, 2012; HIPÓLIDE *et al.*, 2006; KOBAN *et al.*, 2006). O respeito dos mecanismos

envolvidos em tais processos ainda pouco se sabe, mas acreditamos que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal seja o primeiro a ser afetado, devido a condição de estresse gerado pela privação, o que leva a um *up-regulation* na liberação de corticosteroides que por sua vez estão relacionados à supressão ou até apoptose das células de Leydig nos testículos (GAO *et al.*, 2002), de onde vem a maior parte do hormônio testosterona.

Nossos resultados também demonstraram que o IGF-1 se reduz na condição de privação, o que também está de acordo com a maioria dos achados da literatura acerca do tema. Sendo este hormônio a molécula mais potente e efetora dos processos anabólicos mediados pelo GH, é possível perceber que o mesmo desempenha um papel importante no metabolismo. Levando em conta que o GH é marcadamente secretado durante o sono (BAUMGARTNER *et al.*, 1993), pode-se então compreender que a supressão do mesmo leva a diminuição na secreção de IGF-1. Assim nosso trabalho está de acordo com os achados de Everson e Crowley (2004), os quais evidenciam alterações semelhantes em ratos privados de sono. Portanto, ao evidenciarmos todas as alterações hormonais citadas até momento, podemos inferir que tais modificações são capazes de instalar no organismo animal um ambiente altamente catabólico, o que certamente contribuiu com a atrofia muscular encontrada bem como o aumento do metabolismo basal.

Em nosso estudo não fomos capazes de identificar grandes alterações nos hormônios da tireóide, hormônios estes que estão diretamente relacionados ao estado metabólico. Embora o aumento no estado metabólico gerado pela privação de sono nos animais possa sugerir um aumento na atividade da glândula tireóide, elevando os níveis de hormônios tireoideanos, nós não conseguimos encontrar tais resultados. Pelo contrário, nossos resultados demonstraram que o T_4 diminui após a privação de sono e permanece reduzido no momento rebote, enquanto o T_3 tem um pequeno aumento após a privação, mas é reduzido no rebote. Porém, é preciso levar em conta que o T_3 é a molécula biologicamente ativa e que quase todo T_4 que entra nas células é convertida na Triiodotironina. Portanto, nossos resultados apontam para um possível aumento na necessidade por T_3 pelo organismo privado de sono, o que pode estar relacionado com o aumento na taxa metabólica basal. Desta forma, nossos resultados estão de acordo com os achados de Campos-Barros *et al.* (1993), onde eles sugeriram que este pequeno aumento no T_3 em detrimento do T_4 está relacionado ao aumento da enzima 5-Iodotironinadeionidase tipo II com a privação de sono, e a qual faz a conversão do segundo no primeiro.

A taxa metabólica basal dos ratos que sofreram privação do sono paradoxal por 96 horas e agudamente, apresentou um grande aumento. Também foi interessante notar que

durante todos os momentos do dia, o consumo de O₂ dos animais privados de sono foi maior do que os que não sofreram intervenção. Esse consumo de oxigênio aumentado demonstra que o gasto energético dos animais privados de sono foi superior ao dos não privados. Como já mencionado, isto parece ter relação com a atrofia dos diversos tecidos do organismo do animal. Porém, o porquê deste aumento ainda não está bem claro. Alguns autores sugerem que a privação de sono gera uma condição de hipotermia e para evitar a queda excessiva da temperatura corporal o organismo do animal aumenta a produção de calor no tecido adiposo marrom. Isto poderia explicar a diferença encontrada entre ratos e humanos, visto que os segundos geralmente apresentam uma condição inversa, ou seja, tem seu metabolismo diminuído com a privação de sono, e ainda não se sabe se a atividade deste tecido tem o papel significativo em humanos (CYPESS *et al.*, 2009). Assim, alguns autores como Koban e Swinson (2005) observaram que existe, de fato, o aumento na produção de calor no tecido adiposo marrom. Nesta questão, encontramos uma limitação do nosso estudo, pois não foi possível a coleta da temperatura corporal dos animais durante a fase experimental. Outro fato curioso foi que em todos os grupos o comportamento do consumo de O₂ diário se manteve: sendo mais baixo no período claro do dia, e mais elevado no período escuro. Deduzimos deste fato, levando em conta que o maior gasto energético reflete o estado de atividade motora do animal, que os animais têm uma tendência em ser mais ativos durante o período noturno.

Apesar de acreditarmos que de fato exista uma relação muito forte entre a termogênese e a taxa metabólica de ratos na condição de privação de sono, em nosso estudo não foi possível fazer a coleta da temperatura corporal dos animais devido aos procedimentos utilizados. Assim, procuramos investigar mais sobre como as alterações hormonais estão relacionados a este fato. Como já mencionado, o consumo de O₂, em situação normal tem um relação direta com os hormônios tireoidianos. Nossos resultados também demonstraram que há uma tendência na transformação do T₄ em T₃ após a privação de sono, aumentando assim o T₃ plasmático. Este aumento pode então estar relacionado ao aumento na taxa metabólica, pois como sugeriram Klingenberg *et al.* (2012), o organismo privado de sono pode ter uma necessidade aumentada por energia devido à própria privação. Se levarmos em conta que a literatura já demonstrou que a privação de sono conduz o organismo a adquirir o aspecto de um organismo doente, a proposição de Klingenberg faz muito sentido, pois analogamente a situação de *Overtraining*¹⁰, o organismo debilitado tende a requerer mais energia para a

¹⁰ Síndrome onde o atleta treina excessivamente, além da capacidade de recuperação do seu organismo, apresentando queda posterior no seu rendimento.

realização de um mesmo trabalho. Dessa forma, é possível que os hormônios tireoidianos representem um importante fator sobre a taxa metabólica de um organismo privado de sono.

Nosso estudo teve como objetivo entender os processos metabólicos e hormonais que são acometidos pela privação de sono. De acordo com nossos achados, podemos assumir que, de maneira geral, o resultado final destes processos é refletido na massa corporal e principalmente na atrofia muscular destes animais. Portanto, entender como estes fenômenos estão interligados é essencial para a compreensão do processo como um todo. Notamos que as alterações hormonais, bem como a taxa metabólica induzem o organismo do animal a um estado catabólico. Apesar do estado hormonal ser o principal causador desta situação, como já bem descrito na literatura, o estado metabólico aumentado somado ao fator nutricional carregam um peso importante sobre este processo. Apesar de nosso trabalho apresentar alguns esclarecimentos, ainda não é possível afirmar qual dos fatores analisados se desenvolvem primeiro ou quais os mecanismos envolvidos nestas alterações, mas é possível compreender que privação de sono acomete diversos processos que em conjunto determinam um estado fisiopatológico importante.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados neste estudo, concluímos que a privação de sono paradoxal é capaz de aumentar o metabolismo basal de ratos wistar, potencialmente refletindo sobre o ambiente catabólico produzido por esta condição, repercutindo assim no quadro de atrofia muscular do músculo *Tibialis anterior*, bem como na redução da massa corporal total e do peso de outros tecidos, como gorduras, fígado e baço.

Mais estudos são necessários afim de se estabelecer as possíveis intervenções no sentido de minimizar esse achado, sugerimos os uso do exercício físico como alternativa não medicamentosa bem como intervenções nutricionais que possam contribuir com a saúde metabólica e muscular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Veterinary Medical Association (AVMA) . 2000 Report of the AVMA panel on euthanasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.218, n.5, p.669-696. mar. 2001.

ANDERSEN, M.L. *et al.* Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. **Journal of Sleep Research**, Guildford, v.14, n.1, p.83-90, mar. 2005.

ANDRETIC, R.; FRANKEN, P.;TAFTI, M. Genetics of Sleep. **Annual Reviews of Genetics**, Palo Alto, v.42, n.1; p.361-388, dez. 2008.

ASERINSKY, E. The discovery of REM sleep. **Journal of the History of the Neurosciences**, Philadelphia, v.5, n.3, p.213-227, dez. 1996.

BALZANO, S. *et al.* Effect of total sleep deprivation on 5'-deiodinase activity of rat brown adipose tissue. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.127, n.2, p.882-890, ago. 1990.

BAUMGARTNER, A. *et al.* Influence of partial sleep deprivation on the secretion of thyrotropin, thyroid hormones, growth hormone, prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, and estradiol in healthy young women. **Psychiatry Research**, Maryland Heights, v.48, n.2, p.153-178, ago. 1993.

BERGMANN, B.M. *et al.* Sleep deprivation in the rat: V. Energy use and mediation. **Sleep**, Darien, v.12, n.1, p.31-41, fev. 1989.

BERGMANN, B.M. *et al.* Sleep deprivation in the rat: XIX. Effects of thyroxine administration. **Sleep**, Darien, v.18, n.5, p.317-324, jun. 1995.

BREBBIA, D.R.; ALTSHULER, K.Z. Oxygen consumption rate and electroencephalographic stage of sleep. **Science**, Washington, v. 150, n. 3703, p.1621-1623, dez. 1965.

- BOETHEL, C.D. Sleep and the endocrine system: new associations to old diseases. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, Londres, v.8, n.6, p.502-505, nov.2002.
- BONNET, M.H.; ARAND, D.L. Clinical effects of sleep fragmentation versus sleep deprivation. **Sleep Medicine Reviews**, Seattle, v.7, n.4, p.297-310, ago. 2003.
- BONNET, M.H.; BERRY, R.B; ARAND; D.L. Metabolism during normal, fragmented, and recovery sleep. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.73, n.3, p.1112-1118, set. 1991.
- BROUWERS, F.M.; LENDERS, J.W. Sleep-disordered breathing and hypertension. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.343, n.13, p.966-967, set. 2000.
- BUXTON, M.O. *et al.* Adverse Metabolic Consequences in Humans of Prolonged Sleep Restriction Combined with Circadian Disruption. **Science**, Washington, v.4, n.129, p.129-143, abril. 2012.
- CAMPOS-BARROS, A. *et al.* The influence of sleep deprivation on thyroid hormone metabolism in rat frontal cortex. **Neuroscience letters**, Maryland Heights, v.162, n.1-2, p.145-148, nov. 1993.
- CUNNINGHAM, J.J. Body composition as a determinant of energy expenditure: a synthetic review and a proposed general prediction equation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.54, n.6, p.963-969, dez. 1991.
- CYPESS, A. M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **New English Journal of Medicine**, v.360, n.15, p.1509-1517, abril. 2009.
- DAAN, S.; BEERSMA D.G., BORB ÉLY A.A. Timing of human sleep:recovery process gated by a circadian pacemaker. **America n Journal of Physiology**, Bethesda, v.246, n.2, p.161-183, fev. 1984.
- DATTILO, M. *et al.* Paradoxical sleep deprivation induces muscle atrophy. **Muscle Nerve**, v.45, n.3, p.431-433, mar. 2012.

EVERSON, C.A.; REED, H.L. Pituitary and peripheral thyroid hormone responses to thyrotropin-releasing hormone during sustained sleep deprivation in freely moving rats. **Endocrinology**, v.136, n.4, p.1426-1434, abr. 1995.

EVERSON, C.A.; CROWLEY, W.R. Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v.286, n.6, p.1060-1070, fev. 2004.

EVERSON, C.A.; WEHR, T.A. Nutritional and metabolic adaptations to prolonged sleep deprivation in rats. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v.264, n. 2, p.376-387, fev. 1993.

FONTIVIEILLE, A.M. *et al.* Relationship between sleep stages and metabolic rate in humans. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v.267, n.5, p.732-737, nov. 1994.

GAO, H.B. *et al.* Glucocorticoid induces apoptosis in rat leydig cells. **Endocrinology**, v.143, n.1, p.130-138, jan. 2002.

GAMBIENERI, A.; PELUSE, C.; PASQUALI, R. Testosterone levels in obese male patients with obstructive sleep apnea syndrome: relation to oxygen desaturation, body weight, fat distribution and the metabolic parameters. **Journal of Endocrinological Investigation**, Casorezzo, v.26, n.6, p.493-498, jun. 2003.

GARY, K.A. *et al.* Total sleep deprivation and the thyroid axis: effects of sleep and waking activity. **Aviaton, Space and Environmental Medicine**, Alexandria, v.67, n.6, p.513-519, jun. 1996.

GILLIN, C. *et al.* Age-related changes in sleep in depressed and normal subjects. **Psychiatry Research**, v.4, n.1., p.73-78, fev. 1981.

GRANDNER, M.A.; PACK, A.I. Sleep disorders, public health, and public safety. **JAMA**, v.306, n.23, p.2616-2617, dez. 2011.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

HARRISON, Y.; HOME, J.A.; ROTHWELL, A. Prefrontal neuropsychological effects of sleep deprivation in young adults--a model for healthy aging? **Sleep**, Darien, v.23, n.8, p.1067-1073, dez. 2000.

HASKELL, E.H. *et al.* Metabolism and thermoregulation during stages of sleep in humans exposed to heat and cold. **Journal of Applied Physiology: respiratory, environmental and exercise physiology**, Bethesda, v.51, n.4, p.948-54, out. 1981.

HIPÓLIDE, D.C. *et al.* Paradoxical sleep deprivation and sleep recovery: effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats. **Journal of Neuroendocrinology**, Hoboken, v.18, n.4, p.231-238, abr. 2006.

IBER, C *et al.* **The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology and technical specifications**. Westchester: American Academy of Sleep Medicine, 2007.

JOHNSTONE, A.M. *et al.* Factors influencing variation in basal metabolic rate include fat-free mass, fat mass, age, and circulating thyroxine but not sex, circulating leptin, or triiodothyronine. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.82, n.5, p.941-948, nov. 2005.

JOUVET, M. Paradoxical sleep mechanisms. **Sleep**, Darien, v.17, n.8, p.77-83, dez. 1994.

KENNEDY, A.R. *et al.* A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v.292, n.6, p.1724-1739, jun. 2007.

KLINGENBERG, L. *et al.* Short sleep duration and its association with energy metabolism. **Obesity Reviews**, v.13, n.7, p.565-577, jul. 2012.

KNUTSON, K. L. *et al.* The metabolic consequences of sleep deprivation. **Sleep Medicine Reviews**, v.11, n.3, p. 163-178, jun. 2007.

KOBAN, M.; SWINSON, K.L. Chronic REM-sleep deprivation of rats elevates metabolic rate and increases UCP1 gene expression in brown adipose tissue. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v.289, n.1, p.68-74, jul. 2005.

KOBAN, M.; LE, W.W.; HOFFMAN, G.E. Changes in hypothalamic corticotropin-releasing hormone, neuropeptide Y, and proopiomelanocortin gene expression during chronic rapid eye movement sleep deprivation of rats. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 147, n. 1, p. 421–431, jan. 2006.

KUHS, H.; FARBER, D.; TOLLE, R. Serum prolactin, growth hormone, total corticoids, thyroid hormones and thyrotropine during serial therapeutic sleep deprivation. **Biological Psychiatry**, Maryland Heights, v.39, n.10, p.857-864, maio. 1996.

KUHS, H.; TOLLE, R. Sleep deprivation therapy. **Biological Psychiatry**, Maryland Heights, v.29, n.11, p.1129-1148, jun. 1991.

LEPROULT, R.; VAN CAUTER, E. Role of Sleep and Sleep Loss in Hormonal Release and Metabolism. **Endocrine Development**, Basel, v.17, p.11-21. 2010.

LEVIN, B.E. *et al.* Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v.279, n.4, p.1357-1364, out. 2000.

LUBOSHITZKY, R. *et al.* Altered luteinizing hormone and testosterone secretion in middle-aged obese men with obstructive sleep apnea. **Obesity Research**, Silver Spring, v.13, n.4, p.780-786, abr. 2005.

MAQUET, P. Sleep function(s) and cerebral metabolism. **Behavioural Brain Research**, v.69, n.1-2, p.75-83, ago. 1995.

MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. M. **Fundamentos de metodologia científica**. 7.ed. São Paulo: Atlas, 2010.

MARTINS, P.J.F. *et al.* Type of diet modulates the metabolic response to sleep deprivation in rats. *Nutrition and Metabolism*, Londres, v.8, n.1, p.86, dez. 2011.

MATHIS, J. The history of sleep research in the 20th century. **Praxis (Bern. 1994)**, Berna, v.84, n.50, p.1479-1485, dez. 1995.

MINAYO, M. C. S.; SANCHES, O. Quantitativo-Qualitativo: Oposição ou Complementaridade? **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 3, p. 239-262, jul./set. 1993.

PIERS, L.S. *et al.* Is there evidence for an age-related reduction in metabolic rate? **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.85, n.6, p.2196-2204, dez. 1998.

PILCHER, J.J. *et al.* Sleep deprivation in the rat: XI. The effect of guanethidine-induced sympathetic blockade on the sleep deprivation syndrome. **Sleep**, Darien, v.13, n.3, p.218-233, jun. 1990.

RECHTSCHAFFEN, A. *et al.* Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. **Science**, v.221, n.4606, p.182-184, jul. 1983.

RECHTSCHAFFEN, A.; BERGMANN, B.M. Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method. **Behavioural Brain Research**, Maryland Heights, v.69, n.1-2, p.55-63, jul./ago. 1995.

ROEHRS, T.; ROTH, T. Sleep-wake state and memory function. **Sleep**, Darien, v.23, n.3, p.64-68, maio. 2000.

SCHIMID, S.M. *et al.* Disturbed glucoregulatory response to food intake after moderate sleep restriction. **Sleep**, Darien, v.34, n.3, p.371-377, mar. 2011.

SINGH, N.A.; CLEMENTS, K.M.; FIATARONE, M.A. Sleep, Sleep Deprivation, and Daytime Activities A Randomized Controlled Trial of the Effect of Exercise on Sleep. **Sleep**, Darien, v.20, n.2, p.95-101. 1997.

SHEPARD, R.J.; SHEK, P.N. Interactions between sleep, other body rhythms, immune responses, and exercise. **Canadian Journal of Applied Physiology**, Ottawa, v.22, n.2, p.95-116, abr. 1997.

SIEGEL, J.M. Clues to the functions of mammalian sleep. **Nature**, Nova Iorque, v.437, n.7063, p.1264-1271, out. 2005.

SPIEGEL, K.; LEPROULT, R.; VAN CAUTER, E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. **Lancet**, Nova Iorque, v.354, n.9188, p.1435-1439, out. 1999.

SPIEGEL, K. *et al.* Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. **Annals of Internal Medicine**, v.141, n.11, p.846-850, dez. 2004.

STEIGER, A. *et al.* Effects of Hormones on Sleep. **Hormone Research**, Basel, v.49, n.3-4, p.125-130. 1998.

SUCHECKI, D.; TUFIK, S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. **Physiology and Behaviour**, Maryland Heights, v.68, n.3, p.309-316, jan. 2000.

SVENDSEN, O.L.; HASSAGER, C.; CHRISTIANSEN, C. Impact of regional and total body composition and hormones on resting energy expenditure in overweight postmenopausal women. **Metabolism: clinical and experimental**, Naples, v.42, n.12, p.1588-1591, dez. 1993.

TAYLOR, D.J. *et al.* Epidemiology of Insomnia, Depression, and Anxiety. **Sleep**, Darien, v.28, n.11, p.1457-1464, nov. 2005.

TUFIK, S. *et al.*. Paradoxical sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.81, n.3, p.521-538, set. 2009.

TURATO, E.R. Métodos qualitativos e quantitativos na área de saúde: definições diferenças e seus objetos de pesquisa. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.39. n.3, p.507-514, jun. 2005.

URSIN,R.; BJORVATN, B.; HOLSTEN, F.Sleep duration, subjective sleep need, and sleep habits of 40- to 45-year-olds in the Hordaland Health Study. **Sleep**, Darien, v.28, n.10, p.1260-1269, out. 2005.

VAN CAUTER, E. *et al.* Metabolic consequences of sleep and sleep loss. **Sleep Medicine Reviews**, Seattle, v.9, n.1, p.23-28, set. 2008.

WAHRLICH, V.; ANJOS, L.A. Aspectos históricos e metodológicos da medição e estimativa da taxa metabólica basal: uma revisão da literatura. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17, n.4, p.801-817, jul./ago. 2001.

WEBB, P.; HIESTAND, M. Sleep metabolism and age. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.38, n.2, p.257-262, fev. 1975.

WEINSIER, R.L.; SCHUTZ, Y.; BRACCO, D. Reexamination of the relationship of resting metabolic rate to fat-free mass and to the metabolically active components of fat-free mass in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.55, n.4, p. 790-794, abril. 1992.

WHITE, D.P.; WEIL, J.V.; ZWILLICH, C.W. Metabolic rate and breathing during sleep. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.59, n.2, p.384-391, ago. 1985.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Carta de Aprovação CEPUNIFESP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 30 de Julho de 2010.
CEP 0764/10

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) MARCO TÚLIO DE MELLO
Co-Investigadores: Hanna Karen Moreira Antunes, Murilo Dáttilo, Alessandra Medeiros, Marco Tulio de Mello (orientador)
Disciplina/Departamento: Medicina e Biologia do Sono da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Efeitos da privação de sono nas vias tróficas e atróficas da musculatura esquelética de ratos"**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Verificar os efeitos da privação de sono no balanço das vias de síntese e degradação proteica musculares, nas condições de privação de sono, assim como o impacto da privação de sono no processo de recuperação muscular, após o dano induzido pela criolesão ou toxina de cobra..

RESUMO: Estudo com 1260 ratos Wistar, machos, 12 semanas. Anestésico: ketamina e xilazina. Analgésico: buprenorfina ou butorfanol. Eutanásia: decapitação. Serão realizados 3 sub-projetos: protocolo experimental 1- controle, privação de sono de 48h e 96h, as respectivas condições de rebote de sono de 24h e restrições de 7, 14 e 21 dias, com período de rebote de sono de 7 dias, nas condições sem dano muscular e com dano muscular induzido por criolesão e por toxina de cobra. Protocolo experimental 2 - controle, privação de sono de 48h e 96h, as respectivas condições rebote de sono de 24h e restrições de 7, 14 e 21 dias, com período de rebote de sono de 7 dias, sob administração de L-leucina, nas condições sem dano muscular e com dano muscular induzido por criolesão e por toxina de cobra. Protocolo experimental 3- controle, privação de sono de 48h e 96h, as respectivas condições rebote de sono de 24h e restrições de 7, 14 e 21 dias, com período de rebote de sono de 7 dias, sob administração de mofetilina, nas condições sem dano muscular e com dano muscular induzido por criolesão e por toxina de cobra. Para cada protocolo experimental, serão utilizados 10 animais por grupo. Os animais serão sacrificados, o sangue coletado para análise de IGF-1, corticosterona, testosterona e TNF-alfa. Serão retirados os músculos das patas traseiras: sóleo, tibial anterior e plantar para análise das proteínas que compõem as vias tróficas e atróficas da musculatura esquelética e para análise histológica. Serão retirados também amostras de tecido hepático e cardíaco. A privação seletiva de sono paradoxal será realizada pelo método da plataforma múltipla. O aminoácido L-leucina será administrado por gavagem 3 dias antes do procedimento de privação do sono e será



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

mantido pelo tempo que esse procedimento durar. A aplicação da modafinila será realizada ip sempre no período da manhã ao longo de todas as condições de privação e restrição de sono. O procedimento de criolesão será realizado sob anestesia, utilizando-se um bastão metálico resfriado em nitrogênio líquido, diretamente no ventre da musculatura da pata esquerda. Para o protocolo de indução de dano muscular por toxina de cobra, será injetado notexina isolada do veneno de cobra diretamente no ventre do músculo. Para análise histológica do músculo serão realizadas colorações com HE, ATPase e SDH, avaliando-se o remodelamento tecidual, tipo de infiltrado inflamatório, edema necrose, fibras com núcleos centralizados e fibras com nucléolos proeminentes. Serão realizados ensaios de imuno-histoquímica e western blot.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudos tem mostrado que o sono é fundamental para o funcionamento celular, orgânico e sistêmico, sendo sua falta potencialmente prejudicial, alterando comportamento alimentar, regulação glicêmica, pressão arterial, processos cognitivos e eixos hormonais. Este estudo visa verificar os efeitos da privação de sono no balanço das vias de síntese e degradação proteica musculares, nas condições de privação de sono, assim como o impacto da privação de sono no processo de recuperação muscular, após o dano induzido pela criolesão ou toxina de cobra..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos, utilizando metodologia de domínio do laboratório, com infra-estrutura adequada..

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo - R\$ 47655,00.

CRONOGRAMA: 72 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 25/7/2011 e 24/7/2012.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0764/10